



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

EFEITO DO TRATAMENTO POR INTERFERÃO ÔMEGA DE ORIGEM FELINA (rFeIFN- ω) NA EVOLUÇÃO CLÍNICA DE GATOS NATURALMENTE INFECTADOS COM OS VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA (FIV) E LEUCEMIA FELINAS (FELV) E NA EXCREÇÃO DE VÍRUS RESPIRATÓRIOS CONCOMITANTES

Joana Acciaioli Pena Cravo

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI:

Doutor Luís Manuel Morgado Tavares
Doutor Carlos Manuel Lopes Vieira Martins
Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte
Doutora Solange Judite Roque Coelho Alves
Gil

ORIENTADORA

Doutora Solange Judite Roque Coelho Alves
Gil

CO-ORIENTADORA

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

2011

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

EFEITO DO TRATAMENTO POR INTERFERÃO ÓMEGA DE ORIGEM FELINA (rFeIFN- ω) NA EVOLUÇÃO CLÍNICA DE GATOS NATURALMENTE INFECTADOS COM OS VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA (FIV) E LEUCEMIA FELINAS (FELV) E NA EXCREÇÃO DE VÍRUS RESPIRATÓRIOS CONCOMITANTES

Joana Acciaioli Pena Cravo

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI:

Doutor Luís Manuel Morgado Tavares
Doutor Carlos Manuel Lopes Vieira Martins
Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte
Doutora Solange Judite Roque Coelho Alves
Gil

ORIENTADORA

Doutora Solange Judite Roque Coelho Alves
Gil

CO-ORIENTADORA

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

2011

LISBOA

Para os meus pais que tanto admiro e adoro!

AGRADECIMENTOS

A realização da presente tese de mestrado é o culminar de um percurso de seis anos na Faculdade de Medicina Veterinária vastamente preenchido pelo acompanhamento de inúmeros professores, dedicados, competentes e preocupados com a aprendizagem dos seus alunos. Sinto a agradável obrigação de destacar a Professora Doutora Ana Duarte pela sua dedicação e pelos inúmeros conhecimentos que me transmitiu e a Doutora Solange Gil por tudo o que me ensinou, companheirismo e espírito alegre que tornou a realização deste projecto uma etapa bastante agradável da minha vida. Agradeço também ao Rodolfo Leal, à Inês Azevedo e à Clara Cartaxeiro por toda a ajuda dispensada e boa disposição sempre demonstrada. Não esqueço pela sua sabedoria e pela ligação que me proporcionou ao presente trabalho o professor Nuno Félix. Agradeço ao Dr. Gonçalo Vicente que me ajudou a crescer profissionalmente com os seus ensinamentos contínuos, companheirismo, disponibilidade e a todos os restantes médicos do Hospital Escolar da FMV pelos seus contributos para o êxito no estágio realizado no hospital. Agradeço ainda ao Professor Doutor Luís Tavares, à Virbac Portugal, à União Zoófila de Lisboa e ao Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal por tornarem possível a realização deste projecto.

RESUMO

Efeito do Tratamento por Interferão Ómega de Origem Felina (rFeIFN- ω) na Evolução Clínica de Gatos Naturalmente Infectados com os Vírus da Imunodeficiência (FIV) e Leucemia Felinas (FeLV) e na Excreção de Vírus Respiratórios Concomitantes

O vírus da imunodeficiência felina (FIV) e o vírus da leucemia felina (FeLV) são retrovírus responsáveis por duas das doenças infecciosas mais comuns e que põem em risco o bem-estar e a vida dos gatos em todo o mundo. Os imunoestimuladores, tais como os interferões rHuIFN- α e rFeIFN- ω , são amplamente utilizados em Medicina Veterinária no tratamento de gatos com FIV e FeLV. No entanto, a administração de rHuIFN- α a felinos tem limitações devido à produção de anticorpos contra o fármaco. O rFeIFN- ω , recentemente desenvolvido, mostrou um efeito antiviral *in vitro* contra FIV e FeLV assim como contra calicivírus (FCV), herpesvírus (FHV), entre outros vírus felinos. Com o objectivo de estudar os efeitos do rFeIFN- ω em gatos naturalmente infectados por FIV e/ou FeLV assim como nas infecções secundárias presentes nestes animais avaliaram-se diversos parâmetros ao longo da sua aplicação. Dos parâmetros analisados o presente estudo abrange: sinais clínicos; hemogramas; parâmetros bioquímicos; proteinogramas; carga de provírus de FeLV; presença de FCV e carga viral de FHV-1 nas secreções oronasais. A 16 gatos (7 FIV⁺, 6 FeLV⁺ e 3 FIV/FeLV⁺), residentes na União Zoófila de Lisboa administrou-se rFeIFN- ω segundo o protocolo licenciado para o produto (3 ciclos de 5 injeções, 1MU/Kg SID SC). Aos dias 0, 10, 30 e 65 todos os gatos foram submetidos a um exame clínico e a colheitas de amostras de material biológico (sangue e secreções oronasais). 10/16 gatos melhoraram a sua sintomatologia clínica, 5/16 mantiveram a sua condição clínica e 1/16 piorou clinicamente. A carga de provírus de FeLV diminuiu em 2/6 gatos FeLV⁺ e em 2/3 gatos FIV/FeLV⁺, aumentou em 1/6 gatos FeLV⁺ e nos restantes manteve-se durante a terapia. A prevalência de FCV diminuiu de 14/16 gatos ao dia 0 para 0/16 ao dia 65; a carga viral de FHV-1 diminuiu em 14/16 gatos; nos restantes 2 gatos a excreção de partículas virais nunca foi detectada. As alterações observadas nos proteinogramas podem ser indicativas das vantagens da aplicação de rFeIFN- ω . O rFeIFN- ω mostrou-se útil no melhoramento da sintomatologia clínica e no controlo de infecções virais secundárias em gatos FIV⁺, FeLV⁺ e FIV/FeLV⁺.

Palavras-chave: vírus da imunodeficiência felina; vírus da leucemia felina; interferão ómega recombinante felino (rFeIFN- ω).

ABSTRACT

Therapeutic Effects of Feline Interferon Omega (rFeIFN- ω) in the Clinical Evolution of Naturally Infected Cats with Feline Immunodeficiency (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) and in Concomitant Respiratory Virus Excretion

Feline immunodeficiency virus (FIV) and feline leukemia virus (FeLV) are retroviruses responsible for two of the most common infectious diseases that endanger the well-being and the lives of cats around the world. Immunostimulating drugs such as rHuIFN- α and rFeIFN- ω are widely used in Veterinary Medicine for the treatment of FIV and FeLV positive cats but frequent administration of rHuIFN- α is limited due to the production of antibodies against the drug. The recently developed rFeIFN- ω has shown an antiviral effect *in vitro* against both FIV and FeLV, as well as against calicivirus (FCV), herpesvirus (FHV), amongst other feline viruses. With the aim of studying the effects of the rFeIFN- ω in naturally infected cats with FIV and/or FeLV, as well as in secondary infections, several parameters were evaluated throughout the therapy. The parameters analyzed in this study were: clinical signs; complete blood counts; biochemistry parameters; serum protein profile; FeLV proviral load; detection of FCV and FHV-1 viral load in oronasal secretions. A total of 16 cats (7 FIV⁺, 6 FeLV⁺ and 3 FIV/FeLV⁺) housed in a Lisbon animal shelter were subjected to the administration of rFeIFN- ω following the licenced protocol (3 cycles of 5 injections, 1MU/Kg SID SC). On days 0, 10, 30 and 65 all cats were subjected to clinical examination and to collection of biologic material samples (blood and oronasal secretions). 10/16 cats improved their clinical signs, 5/16 remained stable and 1/16 worsened their clinical signs during therapy. FeLV proviral load lowered in 2/6 FeLV⁺ cats and in 2/3 FIV/FeLV⁺ cats, it increased in 1/6 FeLV⁺ cats and the rest remained stable during therapy. The prevalence of FCV was 14/16 on day 0 and 0/16 on day 65; 14/16 lowered FHV-1 viral load while 2 remained negative during the treatment. Changes in protein profile may be an indicator of the benefits of rFeIFN- ω therapy. rFeIFN- ω has proved useful in the improvement of the clinical signs and in controlling concomitant viral infections in FIV⁺, FeLV⁺ and FIV/FeLV⁺ cats.

Key-words: Feline immunodeficiency virus, feline leukemia virus and recombinant feline interferon omega (rFeIFN- ω).

LISTA DE COMUNICAÇÕES CIENTÍFICAS

O trabalho relacionado com esta dissertação foi apresentado em dois posters nos seguintes Congressos internacionais:

Gil S., Leal R., Duarte A., Sepúlveda N., McGahied D., Siborro I., Cravo J., Cartaxeiro C., Niza M., Tavares L. “Complete Blood Count (CBC), Biochemistry and Serum Protein Profile evaluation in Feline immunodeficiency virus (FIV), Feline leukemia virus (FeLV) and co-infected FeLV/FIV cats submitted to Feline-Interferon ω (rFE-IFN ω) therapy”; 21st European College of Veterinary Internal Medicine - Companion Animals (ECVIM-CA) Congress, Setembro de 2011, Sevilha, Espanha.

Gil S., Leal R., Duarte A., Sepúlveda N., McGahied D., Siborro I., Cravo J., Cartaxeiro C., Niza M., Tavares L. “Impact of feline-Interferon ω (rFE-IFN ω) therapy on clinical improvement and control of concomitant viral excretion in FIV (Feline immunodeficiency virus) and FeLV (Feline leukemia virus) infected stray cats”; Southern European Veterinary Conference (SEVC), Setembro e Outubro de 2011, Barcelona, Espanha.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO.....	iii
ABSTRACT	v
LISTA DE COMUNICAÇÕES CIENTÍFICAS	vi
ÍNDICE GERAL	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE TABELAS	x
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiii
LISTA DE SÍMBOLOS	xiv
INTRODUÇÃO	1
1. Estágio Curricular	1
2. Introdução ao Estudo	2
3. Objectivos	3
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
1. Vírus da Imunodeficiência (FIV) e da Leucemia Felina (FeLV)	5
1.1. Genoma e Estrutura Viral	5
1.2. Ciclo Replicativo	6
1.3. Subtipos	7
1.4. Receptores Celulares	8
1.5. Infecção por FIV e FeLV	8
1.5.1. Infecção por FIV	8
1.5.2. Infecção por FeLV	11
1.6. Infecções Virais Concomitantes	13
1.6.1. Calicivírus Felino (FCV)	14
1.6.2. Herpesvírus Felino (FHV)	14
1.7. Diagnóstico	15
1.8. Prevenção e Controlo	16
1.9. Prognóstico	17
1.10. Tratamento	17
1.10.1. Terapia com Indutores de Interferão e Imunomoduladores	18
1.10.2. Terapia Antiviral	18
1.10.3. Interferão	19
1.10.3.1. Interferão Alfa Humano (rHuIFN-α)	21
1.10.3.2. Interferão Ómega Felino (rFeIFN-ω)	22

MATERIAL E MÉTODOS	25
1. Desenho Experimental	25
2. Amostra Populacional	25
3. Plano de Tratamento	26
4. Plano de Colheita das Amostras	26
5. Exame Clínico	27
6. Processamento das Amostras em Laboratório	29
6.1. Detecção de Anticorpos de FIV	30
6.2. Detecção de Antígenos de FeLV	30
6.3. Extração de Ácido Nucleico	31
6.3.1. Extração de ADN	31
6.3.2. Extração Simultânea de ADN e ARN	31
6.4. RT-PCR e PCR em Tempo Real	31
6.4.1. Calicivírus Felino (FCV)	31
6.4.2. Herpesvírus Felino Tipo 1 (FHV-1)	32
6.4.3. Vírus da Leucemia Felina (FeLV)	32
6.4.4. <i>Primers</i> , Sondas e Ciclos de Amplificação de PCR	33
6.5. Análise Estatística	34
RESULTADOS	35
1. Despiste de FIV e FeLV	35
2. Efeito do Tratamento com rFeIFN- ω nos Sinais Clínicos	36
3. Efeito do Tratamento com rFeIFN- ω nos Parâmetros Hematológicos	41
3.1. Hemograma	41
3.2. Parâmetros Bioquímicos	46
3.3. Proteinograma	46
4. Efeito do Tratamento com rFeIFN- ω na Carga de Provírus de FeLV	52
5. Efeito do Tratamento com rFeIFN- ω na Excreção de Vírus Presentes no Tracto Respiratório	54
5.1 Calicivírus Felino (FCV)	54
5.2 Herpesvírus Felino tipo 1 (FHV-1)	55
DISCUSSÃO	59
1. Sinais Clínicos	59
2. Hemograma	60
3. Proteinograma	62
4. Parâmetros Bioquímicos	64
5. Carga de Provírus de FeLV	65

6. Infecções Virais Concomitantes	66
CONCLUSÃO.....	69
BIBLIOGRAFIA	71
ANEXOS.....	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura e genoma do FeLV (a) e do FIV (b) (Adaptado de Rosado, 2009).....	6
Figura 2: Estádios da infecção por FIV (Adaptado de Dunham & Granham, 2008).....	9
Figura 3:Úlceras orais em gato FIV positivo pertencente à amostra populacional do presente estudo.	14
Figura 4: Virbagen® Omega	26
Figura 5: Dias de administração do rFeIFN- ω nos 3 tratamentos realizados.....	26
Figura 6: Dias de administração de rFeIFN- ω (a verde) e das colheitas das amostras (a preto).	27
Figura 7: Fotografia dos resultados da electroforese em gel de agarose relativos à presença de FCV nas excreções oronasais das amostras dos gatos de 1 a 7 (gatos FIV ⁺) no dia 0.....	54

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Identificação numérica dos gatos da amostra populacional.	26
Tabela 2: Parâmetros avaliados no exame clínico e respectivas classificações.....	28
Tabela 3: Procedimentos realizados no laboratório a partir das amostras de sangue e de material biológico da cavidade oronasal.	30
Tabela 4: Sequência nucleotídica dos <i>primers</i> utilizados nos PCRs para amplificação dos diferentes vírus (vírus, identificação do <i>primer</i> , sequência nucleotídica e dimensão do fragmento de ADN a amplificar).	33
Tabela 5: Sondas utilizadas nos PCRs para amplificação dos diferentes vírus (vírus, identificação da sonda, sequência nucleotídica e dimensão do fragmento de ADN a amplificar).	33
Tabela 6: Ciclos de amplificação utilizados para os diferentes vírus.	33
Tabela 7: Resultados dos testes ELISA para confirmação da presença de FIV e/ou FeLV nos gatos dos gatis de FIV e de FeLV da U.Z.L.	35
Tabela 8: Classificação clínica (CC) absoluta e em percentagem, obtida pelo conjunto dos gatos FIV ⁺ , nos diferentes parâmetros do exame clínico mostrando a evolução a partir da diferença de valores obtidos na classificação do dia 0 e do dia 65.....	37
Tabela 9: Parâmetros estatísticos relativos à classificação clínica dos gatos FIV ⁺ durante o tratamento.....	37
Tabela 10: Classificação clínica (CC) absoluta e em percentagem, obtida pelo conjunto dos gatos FeLV ⁺ no exame clínico, mostrando a evolução a partir da diferença de valores obtidos na classificação do dia 0 e do dia 65.....	38
Tabela 11: Parâmetros estatísticos relativos à classificação clínica dos gatos FeLV ⁺ durante o tratamento.....	39
Tabela 12: Classificação clínica (CC) absoluta e em percentagem, obtida pelo conjunto dos gatos FIV/FeLV ⁺ , no exame clínico mostrando a evolução a partir da diferença de valores obtidos na classificação do dia 0 e do dia 65.....	40
Tabela 13: Parâmetros estatísticos relativos à classificação clínica dos gatos FIV/FeLV ⁺ durante o tratamento.....	40
Tabela 14: Variação da média dos diferentes parâmetros do hemograma dos gatos FIV ⁺ , comparando os valores do dia 0 e do dia 65.....	45

Tabela 15: Variação da média dos diferentes parâmetros do hemograma dos gatos FeLV ⁺ , comparando os valores do dia 0 e do dia 65.....	45
Tabela 16: Variação da média dos diferentes parâmetros do hemograma dos gatos FIV/FeLV ⁺ , comparando os valores do dia 0 e do dia 65.....	46
Tabela 17: Valores do proteinograma ao dia 0 e 65 nos gatos FIV ⁺	47
Tabela 18: Variação da média dos diferentes parâmetros do proteinograma dos gatos FIV ⁺ , comparando os valores do dia 0 e do dia 65.....	48
Tabela 19: Valores do proteinograma ao dia 0 e 65 nos gatos FeLV ⁺	49
Tabela 20: Variação dos diferentes parâmetros do proteinograma dos gatos FeLV ⁺ , comparando os valores do dia 0 e do dia 65.....	50
Tabela 21: Valores do proteinograma ao dia 0 e 65 nos gatos FIV/FeLV ⁺	50
Tabela 22: Variação da média dos diferentes parâmetros do proteinograma dos gatos com FIV/FeLV ⁺ , comparando os valores do dia 0 e do dia 6.....	51
Tabela 23: Carga de provírus de FeLV nos gatos FeLV ⁺ e FIV/FeLV ⁺ avaliada durante o tratamento e a respectiva variação.....	52
Tabela 24: Número de gatos, e respectiva percentagem, que se apresentaram a excretar FCV nos diferentes dias avaliados durante o tratamento.....	54

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Distribuição dos gatos infectados, em número absoluto, dos três grupos da amostra populacional (FIV ⁺ , FeLV ⁺ e FIV/FeLV ⁺).....	36
Gráfico 2: Evolução clínica dos gatos FIV ⁺ avaliada pelos 4 exames clínicos realizados ao longo do tratamento.....	36
Gráfico 3: Evolução clínica dos gatos FeLV ⁺ avaliada pelos 4 exames clínicos realizados ao longo do tratamento.....	38
Gráfico 4: Evolução clínica dos gatos FIV/FeLV ⁺ avaliada pelos 4 exames clínicos realizados ao longo do tratamento.....	39
Gráfico 5: Distribuição dos gatos, em percentagem, no final do tratamento conforme a sua evolução clínica.....	41
Gráfico 6: Variação da concentração de eritrócitos nos gatos FIV ⁺ durante o tratamento.....	41
Gráfico 7: Variação da concentração de eritrócitos nos gatos FeLV ⁺ durante o tratamento....	42
Gráfico 8: Variação da concentração de eritrócitos nos gatos FIV/FeLV ⁺ durante o tratamento.....	42
Gráfico 9: Variação da concentração média de eritrócitos, e respectivo erro padrão, nos grupos de gatos FIV ⁺ , FeLV ⁺ e FIV/FeLV ⁺ durante o tratamento.....	43
Gráfico 10: Variação da concentração de leucócitos nos gatos FIV ⁺ durante o tratamento....	43
Gráfico 11: Variação da concentração de leucócitos nos gatos FeLV ⁺ durante o tratamento...	44
Gráfico 12: Variação da concentração de leucócitos nos gatos com FIV/FeLV ⁺ durante o tratamento.....	44
Gráfico 13: Variação da concentração média de leucócitos, e respectivo erro padrão, dos grupos de gatos FIV ⁺ , FeLV ⁺ e FIV/FeLV ⁺ durante o tratamento.....	45
Gráfico 14: Variação da concentração média e erro padrão dos diferentes parâmetros do proteinograma nos gatos FIV ⁺ durante o tratamento.....	47

Gráfico 15: Variação da concentração média e erro padrão dos diferentes parâmetros do proteinograma nos gatos FeLV ⁺ durante o tratamento.....	49
Gráfico 16: Variação da concentração média e erro padrão dos diferentes parâmetros do proteinograma nos gatos FIV/FeLV ⁺ durante o tratamento.....	51
Gráfico 17: Variação da carga de provírus de FeLV nos gatos FeLV ⁺ comparando a carga proviral entre o dia 0 e o dia 65.	53
Gráfico 18: Variação da carga de provírus de FeLV nos gatos FIV/FeLV ⁺ comparando a carga proviral entre o dia 0 e o dia 65.	53
Gráfico 19: Variação da carga viral de FHV-1 durante o tratamento no gato 1 (gato FIV ⁺). ..	55
Gráfico 20: Variação da carga viral de FHV-1 durante o tratamento nos gatos 1, 3, 4 e 5 (gatos FIV ⁺).....	55
Gráfico 21: Variação da carga viral de FHV-1 durante o tratamento nos gatos 8, 9, 11 e 13 (gatos FeLV ⁺).....	56
Gráfico 22: Variação da carga viral de FHV-1 durante o tratamento nos gatos 10 e 12 (gatos FeLV ⁺).	56
Gráfico 23: Variação da carga viral de FHV-1 durante o tratamento nos gatos FIV/FeLV ⁺	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADN- Ácido Desoxirribonucleico
ALT- Alanina aminotransferase
ARN- Ácido Ribonucleico
ARNm- ARN mensageiro
AST- Aspartato aminotransferase
AZT- Zidovudina
CA- Cápside
CC- Classificação clínica
dUTPase- Desoxiuridina pirofosfatase
EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA- *Enzyme-linked immunosorbent assay*
EPO- Eritropoietina
EUA- Estados Unidos da América
FAIDS- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida Felina
FCV- Calicivírus Felino
FeLV- Vírus da Leucemia Felina
FeLV⁺- FeLV positivo
FHV- Herpesvírus Felino
FHV-1- Herpesvírus Felino tipo 1
FIV- Vírus da Imunodeficiência Felina
FIV⁺- FIV positivo
FIV/FeLV⁺- Positivo a FIV e a FeLV
FMV- Faculdade Medicina Veterinária
g- Grama
g- Força centrífuga relativa
GM-CSF- Factor estimulante das colónias de macrófagos e granulócitos
HIV- Vírus da Imunodeficiência Humana
Ht- Hematócrito
HTLV- Vírus T-linfotrófico Humano
IF- Imunofluorescência
IFN- Interferão
Ig- Imunoglobulina
IL- Interleucina
IM- Via Intramuscular
IN- Integrase
IP- Intraperitoneal
LTR- *Long terminal repeats*
Kg- Quilograma
MA- Matriz Proteica
M-CSF- Factor de estimulação da colónia dos macrófagos
MuLV- Vírus da Leucemia Murina
mg- miligrama
Nº - Número
ml- mililitro
NC- Nucleocápside
nm- Nanómetros
UI- Unidade Internacional
UM- Milhões de Unidades
UTL- Universidade Técnica de Lisboa
UZL- União Zoófila de Lisboa

ORF- *Open Reading Frame*
 Pb- Pares de Bases
 PBS- Solução Salina Fosfatada
 PCR- *Polymerase Chain Reaction*
 PO- *per os*, via oral
 PR- Protease
 PTs- Proteínas totais
 Rel A/G- Relação albumina/globulina
 rFeIFN- ω - Interferão ômega recombinante felino
 Rh-EPO- Eritropoietina recombinante humana
 rhGM-CSF - Factor recombinante humano estimulante das colónias de macrófagos e granulócitos
 RT- Transcriptase Reversa
 RT-PCR- Transcriptase Reversa - *Polymerase Chain Reaction*
 SI- Sistema imunitário
 SIFN- Sistema interferão
 SID- Uma vez ao dia
 SC- Via subcutânea
 SNC- Sistema Nervoso Central
 SU- Glicoproteína de superfície
 TAC- Tomografia axial computadorizada
 TAE- Tris-Acetato-EDTA
 TM- Glicoproteína transmembranária
 TNF- α - Factor de Necrose Tumoral alfa
 μ g – micrograma

LISTA DE SÍMBOLOS

ω - Ómega
 ® - Marca registada
 β - Beta
 α - Alfa
 γ - Gamma
 °C - Graus Celsius
 % - Percentagem

INTRODUÇÃO

1. Estágio Curricular

O meu estágio curricular distribuiu-se por dois períodos:

-De 1 de Setembro de 2010 a 31 de Janeiro de 2011 decorreu no Laboratório de Virologia e Biologia Molecular da Faculdade de Medicina Veterinária (Prof. Dr. Luís Tavares), da Universidade Técnica de Lisboa, sob a orientação científica da Doutora Solange Judite Roque Coelho Alves Gil e co-orientação da Professora Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte.

-De 1 de Fevereiro de 2011 a 31 de Maio de 2011 decorreu no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária.

No Laboratório de Virologia e Biologia Molecular da Faculdade de Medicina Veterinária colaborei no estudo em curso sobre os efeitos da aplicação do interferão ómega recombinante de origem felina em gatos infectados com os vírus da imunodeficiência felina e o vírus da leucemia felina. Neste período executei os procedimentos necessários à realização do presente trabalho de dissertação, que incluíram, entre outros, a aplicação da terapia aos gatos em estudo, colheitas de amostras biológicas, exames clínicos e também todos os procedimentos laboratoriais executados que se encontram descritos na presente tese de mestrado.

O estágio no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária, permitiu-me observar boas práticas clínicas, desenvolver o raciocínio crítico e científico e executar uma série de actividades que me desenvolveram competências em diversas áreas clínicas: cirurgia, imagiologia, medicina interna, internamento de pequenos animais. No serviço de Medicina Interna assisti e participei activamente nas consultas e no serviço de internamento prestei os cuidados necessários aos animais que se encontravam internados. Executei vários procedimentos médicos como: administração de fármacos injectáveis, venopunção para colocação de cateteres, colheita de sangue para análise, limpeza de feridas e do pavilhão auricular, execução de pensos, observação com otoscópio, raspagens cutâneas, exame com lâmpada de Wood, observação de esfregaços sanguíneos, algaliação, toracocenteses, lavagens vesicais, enemas, fornecimento de oxigénio, administração de vários tipos de medicação, entre outros. No serviço de cirurgia assisti a vários tipos de cirurgias e participei activamente em algumas delas. As tarefas desempenhadas variaram consoante a necessidade do cirurgião, englobando os papéis de anestesista, circulante ou ajudante de cirurgião. Participei na escolha e administração da medicação pré-anestésica, indução anestésica, colocação do tubo endotraqueal e monitorização da anestesia volátil. No âmbito da imagiologia assisti e ajudei

na realização de exames radiográficos, como radiografias simples, radiografias de trânsito baritado ou mielografias, de exames ecográficos e de TACs. Colaborei ainda, nas consultas de animais exóticos, tendo assistido e participado em algumas intervenções cirúrgicas e fiz o acompanhamento pós-cirúrgico de vários animais.

2. Introdução ao Estudo

O presente trabalho completa o Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária (FMV) da Universidade Técnica de Lisboa, e pretende avaliar o efeito da terapêutica com interferão ómega de origem felina (rFeIFN- ω) em gatos naturalmente infectados com o vírus da imunodeficiência felina (FIV), vírus da leucemia felina (FeLV) e co-infectados por ambos os vírus.

3. Objectivos

Este estudo pretende avaliar o efeito do tratamento com interferão ómega de origem felina (rFeIFN- ω) em gatos naturalmente infectados pelo vírus da imunodeficiência felina (FIV), vírus da leucemia felina (FeLV) e co-infectados, e ainda, o seu efeito em agentes concomitantes, nomeadamente outros vírus presentes no tracto respiratório destes mesmos animais. A um conjunto de 16 gatos naturalmente infectados, onde sete são FIV positivos, seis são FeLV positivos e 3 são FIV e FeLV positivos, administrou-se rFeIFN- ω segundo o protocolo licenciado para o medicamento. Estes animais foram sujeitos a exames clínicos, colheitas de sangue e de material biológico da cavidade oronasal e, ao longo do tratamento, analisou-se a variação:

- I) Do estado clínico (sinais clínicos);
- II) Dos parâmetros hematológicos: hemograma, parâmetros bioquímicos hepáticos (alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase), renais (ureia e creatinina) e proteinograma;
- III) Da carga de provírus de FeLV;
- IV) Da carga viral presente nas secreções oronasais, relativa a infecções concomitantes presentes no tracto respiratório (Herpesvírus Felino e Calicivírus Felino).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Vírus da Imunodeficiência (FIV) e da Leucemia Felina (FeLV)

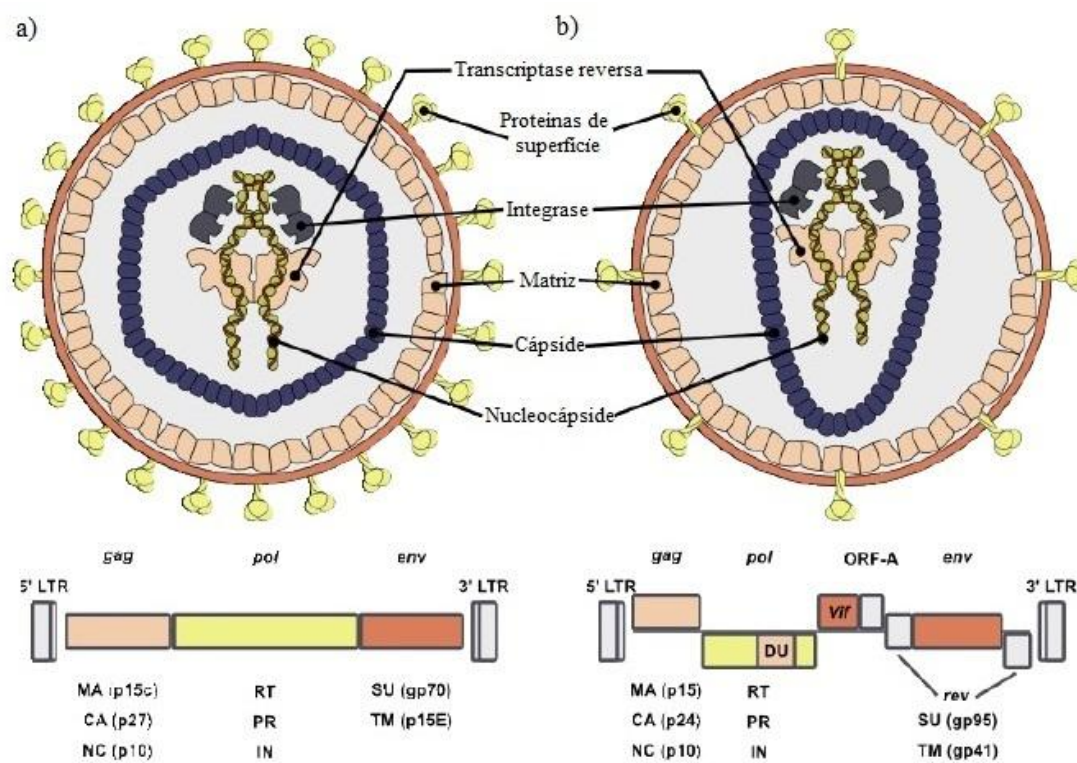
O vírus da imunodeficiência felina (FIV) e o vírus da leucemia felina (FeLV) são retrovírus responsáveis por duas das doenças infecciosas mais comuns e que põem em risco o bem-estar e a vida dos gatos em todo o mundo (Hartmann, 2011); estima-se que a prevalência de FIV seja de 1 a 14% em gatos sem sintomatologia clínica e acima de 44% em gatos com sinais clínicos (Hosie et al., 2009) enquanto a prevalência de FeLV varia entre 1 a 18% em animais sem sintomatologia e cerca de 30,4% em animais com sinais clínicos (Lutz et al., 2009). O FIV foi descrito pela primeira vez em 1987 após o seu isolamento a partir de células de gatos domésticos pertencentes a uma colônia existente em Davis, na Califórnia, com elevada prevalência de infecções secundárias e doenças degenerativas. Os animais apresentavam sinais clínicos como anorexia, leucopénia, pirécia, gengivite, diarreia e perda de peso (Pedersen, Ho, Brown & Yamamoto, 1987). O FeLV foi descoberto em 1964 por William Jarret e a sua equipa quando se detectaram partículas virais na membrana de linfoblastos num gato com linfoma (Jarret, Crawford, Martin & Davie, 1964). O FIV pertence à família *Retroviridae*, sub-família *Orthoretrovirinae* e ao género *Lentivirus* (Sellon & Hartmann, 2006) enquanto o FeLV partilha com este a família e sub-família mas pertence ao género *Gammaretrovirus* (Pepin et al, 2007; Levy et al., 2008).

1.1. Genoma e Estrutural Viral

Os retrovírus possuem um genoma de ácido ribonucleico (ARN). A organização genómica da família dos retrovírus é semelhante, possuindo os genes *gag*, *pol* e *env* (Dunham & Graham, 2008). O gene *gag* (“*group specific antigen*”) codifica as proteínas estruturais internas do vírus, que incluem as proteínas da matriz (MA), da cápside (CA) e da nucleocápside (NC) (Gómez-Lucía, Collado, Miro & Doménech, 2009). O gene *pol* codifica as enzimas polimerase, integrase (IN) e transcriptase reversa (RT), responsáveis pela replicação viral (Gómez-Lucía et al., 2009). No FIV, este gene codifica uma proteína adicional, a desoxiuridina pirofosfatase (dUTPase). O gene *env* (envelope) codifica as glicoproteínas de superfície (SU) e transmembranares (TM) do invólucro viral (Dunham & Graham, 2008). Os lentivírus possuem outros genes acessórios como o *vif*, o *rev* e outros, que codificam proteínas não estruturais, relevantes na regulação da expressão viral, replicação e patogenia (Gómez-Lucía et al., 2009). O genoma viral é ladeado nos dois extremos pelas “*long terminal repeats*”

(LTRs) que são sequências nucleotídicas repetidas que desempenham funções reguladoras da expressão e replicação viral (Hartmann, 2006) (Figura 1).

Figura 1: Estrutura e genoma do FeLV (a) e do FIV (b) (Adaptado de Rosado, 2009).



Legenda: Matriz (MA); cápside (CA); nucleocápside (NC); transcriptase reversa (RT); protease (PR); integrase (IN); glicoproteínas de superfície (SU); glicoproteínas transmembranares (TM); desoxiuridina pirofosfatase (DU); *long terminal repeats* (LTR); genes *gag*, *pol*, *env*, *vif*, ORF-A e *rev*.

1.2. Ciclo Replicativo

As partículas virais ligam-se aos receptores das células hospedeiras através das glicoproteínas do invólucro e penetram no seu interior (Hartmann, 2011). O genoma viral é libertado e a enzima transcriptase reversa converte a cadeia de ARN genómico viral em ADN de dupla cadeia (Dunham & Graham, 2008). Este ADN é integrado no genoma da célula hospedeira, por intermédio da integrase viral, passando a ser designado por provírus (Hartmann, 2006). Após a integração do provírus na célula infectada, esta passa a sintetizar proteínas virais de acordo com o mecanismo convencional de transcrição e tradução celular (Hosie et. al., 2009). As células que possuem ADN proviral no seu genoma ficam persistentemente infectadas, além de o transmitirem às células filhas (Bendinelli et al., 1995). O FeLV pode manter-se inactivo, ou seja, em fase de latência, não havendo produção de partículas virais, pelo que o

sistema imunitário do animal infectado não detecta a sua presença (Dunham & Graham, 2008).

1.3. Subtipos

Existem 4 subtipos de FeLV: A; B; C e T (Nakata et al., 2003; Hartmann, 2006) que se distinguem por diferenças na sequência nucleotídica do gene *env*. O FeLV-A é o subtipo predominante e está presente em todos os animais infectados por FeLV (Hartmann, 2006; Levy et al., 2008). Este é o único subtipo que se transmite horizontalmente *in vivo* (Hartmann, 2006; Levy et al., 2008). O FeLV-B está presente em cerca de 50% dos gatos infectados, resultando de recombinação entre os genes *env* do subtipo A e o ADN proviral de um tipo de FeLV endógeno¹ e é apenas transmitido quando em associação com o subtipo A (Lutz et al., 2009). A co-infecção com este subtipo aumenta a neuropatogenicidade e a incidência de neoplasias (Pan, Zhong, Chang & Roy-Burman, 2003; Tandon et al., 2005). O FeLV-C resultou de uma mutação no gene *env* (Lutz et al., 2009), aparecendo em cerca de 1% dos gatos infectados (Tandon et al., 2005); estes animais tendem a desenvolver anemia severa (Dunham & Granham, 2008). O subtipo T (FeLV-T) possui tropismo para linfócitos T e resultou de múltiplas mutações do gene *env*, causa imunossupressão e é extremamente citopático (Hartmann, 2006).

No que respeita ao FIV existem pelo menos 5 subtipos deste vírus: A; B; C; D e E. Estes subtipos definem-se com base na sequência nucleotídica das regiões variáveis do gene *env* (Kusuhara et al., 2005; Dunham, 2006). Um sexto subtipo, F, foi proposto, mas ainda não foi totalmente caracterizado (Hayward, Taylor & Rodrigo, 2007). O subtipo A foi identificado na Califórnia, Austrália e Europa (Greene, Meers, Chadwick, Carnegie & Robinson, 1993; Bachmann et al., 1997, Pistello et al., 1997); o subtipo B no Japão, na região central e leste dos EUA e Europa (Bachmann et al., 1997, Nishimura et al., 1998, Duarte & Tavares, 2006); o subtipo C foi isolado no Canadá, Europa e Formosa (Sodora et al., 1994; Kakinuma et al. 1995, Inada et al. 1997); o subtipo D foi identificado no Japão (Kakinuma et al., 1995) e o subtipo E na Argentina (Pecoraro et al., 1996). Os subtipos com maior frequência são o A e o B (Duarte & Tavares, 2006) e estudos recentes demonstraram a ocorrência de subgrupos dentro do subtipo B (Steinrigl & Klein 2003, Weaver, Collisson, Slater & Zhu, 2004, Duarte & Tavares, 2006), o que reflecte a elevada diversidade genética viral (Sodora et al. 1994, Bachmann et al., 1997).

¹ São sequências de genes virais, não patogénicas, normalmente presentes no genoma felino, incapazes de produzir partículas virais infecciosas. Estes vírus endógenos podem sofrer recombinação genética com o ADN do FeLV exógeno e deste modo aumentar a patogenicidade deste (Roy-Burman, 1995; Hartmann, 2006).

1.4. Receptores Celulares

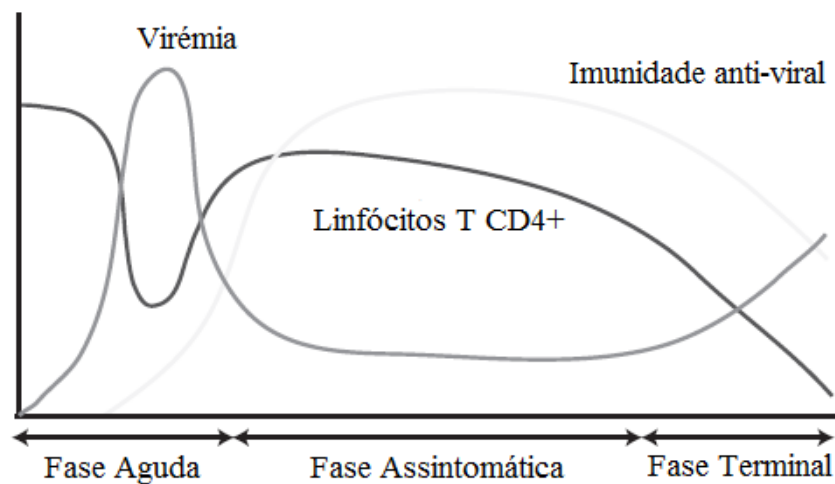
A entrada dos viriões na célula é mediada pela ligação a receptores celulares específicos através das glicoproteínas presentes no invólucro viral (Hartmann, 2011). Na infecção por FIV a entrada dos viriões é mediada por um receptor e um co-receptor. O receptor primário é o CD134 e expressa-se nos linfócitos T CD4⁺, linfócitos B e macrófagos activados (Shimojima et al., 2004; Willett et al., 2007; Willett et al., 2007). O co-receptor é o CXCR4, análogo ao usado pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). O FeLV infecta as células através da interacção com vários receptores, dependendo do subtipo viral (Dunham & Granham, 2008). O receptor “*putative thiamine transport protein*” (fTHTR1) tem sido identificado como o receptor do FeLV-A (Mendoza, Anderson & Overbaugh, 2006; Helfer-Hungerbuehler et al., 2011). O receptor celular do FeLV-B é o “*sodium-dependant inorganic phosphate transporters*”, Pit1 e Pit2 (Anderson, Luring, Robertson, Dirks & Overbaugh, 2001). O FeLV-C utiliza o receptor FLVCR1, uma “*heme-exporting protein*”, presente nas células hematopoiéticas (Quigley et al., 2000). O FeLV-T utiliza o receptor “*membrane-spanning receptor*”, FePit1, e o cofactor FeLIX, expresso nos linfócitos T (Cheng, Anderson & Overbaugh, 2007; Dunham & Granham, 2008). Após a entrada do vírus na célula hospedeira, o receptor celular sofre alterações, impedindo a entrada de outros viriões nessa célula (Helfer-Hungerbuehler et al., 2011). Este processo é conhecido como “*superinfection interference*” e pode dever-se a internalização e/ou disfunção do receptor (Helfer-Hungerbuehler et al., 2011).

1.5. Infecção por FIV e FeLV

1.5.1. Infecção por FIV

A maioria das infecções por FIV ocorre pela inoculação do vírus através de mordedura (Hosie et al., 2009). Assim, este vírus afecta principalmente gatos adultos, machos, inteiros e de vida livre pois são os mais propensos ao envolvimento em lutas (Dunham, 2006; Cohn, 2007). A transmissão vertical, de mães para filhos, está demonstrada experimentalmente com evidências de transmissão intra-uterina, durante o parto e através do colostro e leite maternos (Allison & Hoover, 2003). No entanto, estes meios de transmissão são raros na natureza (Hosie et al., 2009). As vias oronasal e venérea não têm sido documentadas como meios de transmissão para FIV (Hosie et al., 2009). Tal como a infecção por HIV, o curso da infecção por FIV pode ser classificado em vários estádios (Dunham & Granham, 2008) (Figura 2).

Figura 2: Estádios da infecção por FIV (Adaptado de Dunham & Granham, 2008).



Depois do vírus entrar no organismo há infecção inicial das células linfóides e mielomonocíticas e, após o genoma viral se integrar no genoma destas células hospedeiras, estas tornam-se persistentemente infectadas (Hartmann, 2006). Durante a fase aguda o vírus replica-se rapidamente em células dendríticas, macrófagos e linfócitos T CD4⁺, levando à libertação de partículas virais que proporcionam um pico de virémia que ocorre entre as 8 e as 12 semanas após a infecção (Dunham & Granham, 2008). Durante esta fase, que pode durar vários meses, há desenvolvimento de um quadro clínico leve e transitório, associado à replicação viral, que pode incluir anorexia, letargia, febre, sinais de enterite, de estomatite, infecções respiratórias e linfadenomegália generalizada (Hartmann, 2011). Esta sintomatologia tende a desaparecer rapidamente, porém há sinais clínicos, como a linfadenomegália, que podem permanecer durante semanas ou meses (Hartmann, 2011). A replicação viral é controlada pela resposta imunitária contra o vírus. Linfócitos T Citotóxicos (CD8⁺) específicos para FIV podem ser detectados no sangue 1 semana após a infecção (Dunham & Granham, 2008). A diminuição da carga viral plasmática, que está associada ao desenvolvimento de resposta imunitária antiviral, leva ao desenvolvimento da chamada fase assintomática que pode durar vários anos ou prolongar-se até ao fim da vida do gato e, durante este tempo, tal como o nome indica, o animal encontra-se livre de sintomatologia clínica (Hartmann, 2011) (Figura 2). Durante a fase assintomática a carga viral mantém-se estável e em níveis relativamente baixos, no entanto há um declínio progressivo dos linfócitos T CD4⁺ que pode ser suficiente para desencadear um estado de imunodeficiência. Nos estádios terminais da infecção há diminuição da resposta imune antiviral, havendo novamente um aumento da carga viral plasmática (Dunham & Granham, 2008) (Figura 2). Durante esta fase o FIV pode causar uma síndrome de imunodeficiência adquirida felina (FAIDS) onde é

comum o desenvolvimento de infecções bacterianas secundárias, principalmente no tracto respiratório superior, cavidade oral e na conjuntiva, e também enterite crónica, doenças de pele, doenças neurológicas e neoplasias (Ravi, Wobeser, Taylor & Jackson, 2010). Há também desenvolvimento de infecções oportunistas, tais como as causadas por *Cryptococcus*, *Micobactérias*, *Demodex* e outros parasitas (Dunham & Granham, 2008). A estimulação imunológica provocada pelo FIV pode resultar em doenças imuno-mediadas. Em casos menos frequentes o vírus pode provocar sintomatologia neurológica (Hosie et al., 2009). Estes gatos têm ainda uma probabilidade acrescida de desenvolver linfoma e leucemia quando comparados com gatos não infectados (Couto, 2001; Hartmann, 2011). O curso da infecção depende em parte da virulência do vírus mas também de outros factores, entre eles, a susceptibilidade ou resistência genética do animal infectado. A regressão total da infecção por FIV nunca foi documentada, contudo o vírus pode manter-se no organismo sem manifestações clínicas de doença (Dunham & Granham, 2008).

As principais alterações hematológicas descritas nas infecções por FIV incluem anemia, leucopenia, neutropenia, diminuição da concentração de aspartato aminotransferase (AST) e glutamato desidrogenase e aumento das concentrações de proteínas totais (PTs) e de globulina gama (globulina- γ) (Shelton & Linenberger, 1995; Gleich & Hartmann, 2009; Sprague, Terwee & Vandewoude, 2010). A elevada concentração destas últimas deve-se a uma excessiva resposta imunitária do organismo (Gleich & Hartmann, 2009). Esta hipergamaglobulinemia reflecte a hiperestimulação dos linfócitos B e é uma consequência directa da infecção por FIV pois gatos assintomáticos positivos a FIV também apresentam hipergamaglobulinemia (Taylor et al., 2010). Além do aumento de imunoglobulinas, há um aumento do número de imuno-complexos em circulação e a sua deposição em certos órgãos pode levar ao desenvolvimento de afecções como glomerulonefrites e uveítes (Gleich & Hartmann, 2009). Há também uma diminuição da relação dos linfócitos T $CD4^+$ / $CD8^+$. As causas da diminuição da concentração de linfócitos T $CD4^+$ incluem o decréscimo na sua produção devido à infecção da medula óssea e do timo, lise das células infectadas devido ao efeito citopático do vírus, destruição das células infectadas pelo sistema imunitário e morte por apoptose (Hartmann, 2011). A perda de linfócitos T $CD4^+$ só por si pode influenciar o estado imunitário, pois estas células desempenham um papel importante na promoção e manutenção da resposta imunitária humoral e celular (Hartmann, 2011). Para além destas alterações imunológicas, são também referidas a diminuição da capacidade de proliferação dos linfócitos em resposta a estímulos antigénicos; diminuição da capacidade de adesão e migração dos neutrófilos, em resposta a infecções bacterianas, (Heit et al., 2006); diminuição

da actividade das células NK (*Natural Killer*) na fase aguda da infecção e aumento na fase assintomática (Hartmann, 2011); aumento da produção de interferão (IFN), de factor de necrose tumoral (TNF) e de interleucinas (IL), IL-4, IL-6, IL-10 e IL-12 (Lehman et al., 2009).

1.5.2. Infecção por FeLV

Na transmissão horizontal, a inoculação viral ocorre principalmente por via oronasal ou através de feridas resultantes de mordeduras (Gomes-Keller et al., 2006; Hofmann-Lehmann et al., 2006; Collado et al., 2007). A transmissão é favorecida em locais com elevadas densidades populacionais devido à partilha de tigelas de comida, de água e de camas (Tejerizo et al., 2005; Gomes-Keller et al., 2006). Após a entrada do vírus no organismo, este replica-se inicialmente na orofaringe, principalmente nos linfócitos e macrófagos tonsilares (Dunham & Granham, 2008). Posteriormente, se a resposta imunitária não intervir adequadamente, ocorre disseminação sistémica do vírus através, principalmente, de linfócitos e monócitos - fase de virémia inicial. Após o desenvolvimento de virémia, o vírus atinge rapidamente os tecidos alvo, constituídos por células de rápida divisão celular - linfóides, mielóides e epiteliais (Hartmann, 2011). Os gatos que desenvolvem uma boa resposta imunológica podem ser capazes de combater a infecção de forma a eliminar o vírus do seu organismo (cerca de 60% dos gatos infectados) (Dunham & Granham, 2008) antes deste atingir a medula óssea. Estes gatos tendem a apresentar elevados níveis de anticorpos neutralizantes, o que lhes confere imunidade futura durante vários anos (Hartmann, 2006). Em aproximadamente 30% dos gatos infectados a carga viral ultrapassa a capacidade do sistema imunológico e, por isso, os animais desenvolvem uma virémia persistente (Dunham & Granham, 2008). O desenvolvimento ou não de virémia persistente depende de vários factores, entre os quais: a idade do animal no momento da exposição, a concentração do vírus, via de transmissão e doenças concomitantes (Dunham & Granham, 2008). A maioria dos gatos com virémia persistente desenvolve doença relacionada com FeLV, incluindo neoplasias e tende a morrer num período de 3 anos. Após aproximadamente 3 semanas de virémia a infecção pode atingir a medula óssea infectando os precursores das células hematopoiéticas. Quando isto sucede, desenvolvem-se elevados níveis de virémia. Só nesta fase se torna possível a detecção de antigénios intracelulares nas plaquetas e granulócitos (Hartmann, 2006). As células infectadas pelo vírus são reconhecidas pelo sistema imunitário e destruídas (Hartmann, 2006). Após infecção da medula óssea é ainda possível debelar a virémia (Gomes-Keller et al., 2006; Pinches et al., 2007), embora os animais se mantenham portadores do provírus (Hartmann, 2006), e nesta fase a infecção toma a designação de latente (Torres, Mathiason & Hoover,

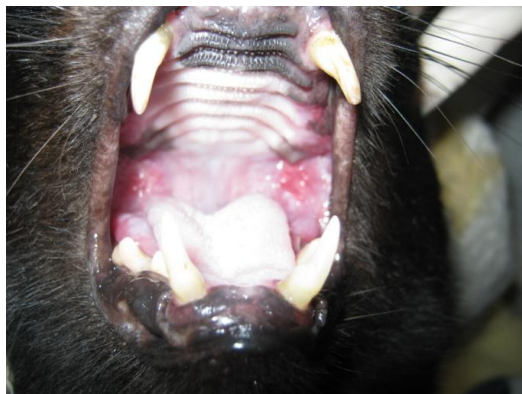
2005; Collado et al., 2007; Hofmann-Lehmann et al., 2007). Durante esta fase não há produção nem excreção de partículas virais e os animais encontram-se sem evidência de sinais clínicos associados ao vírus, à excepção do possível aparecimento de neoplasias ou mielodisplasias (Hartmann, 2006). A infecção pode ser reactivada em situações de imunossupressão, após administração de corticosteróides, durante a gravidez e em situações de stress (Gomes-Keller et al., 2006). A imunossupressão causada por FeLV é mais severa e complexa que a causada por FIV. Embora o mecanismo exacto não se encontre completamente clarificado têm sido identificadas como possíveis causas a atrofia do timo, neutropénia, linfopénia (perda de linfócitos T CD4+ e CD8+) e alteração da função dos neutrófilos (Linenberger & Abkowitz, 1995; Hartmann, 2006). Em alguns gatos há diminuição da produção de imunoglobulinas, interleucina 2 (IL-2) e interleucina 4 (IL-4), aumento do factor de necrose tumoral- α (TNF- α) no plasma e a diminuição significativa de factores de estimulação dos linfócitos B produzidos pelos linfócitos T (Hartmann, 2006). As alterações hematológicas são mais frequentes em animais com FeLV em comparação com os animais com FIV (Shelton & Linenberger, 1995; Gleich & Hartmann, 2009). Algumas das alterações hematológicas que podem estar presentes em gatos infectados por FeLV incluem anemia, trombocitopénia, neutropénia e diminuição do hematócrito e da concentração de hemoglobina (de Mari, Maynard, Sanquer, Lebreux & Eun, 2004; Cohn, 2007; Collado et al., 2007; Gleich & Hartmann, 2009). No que respeita aos parâmetros bioquímicos, é comum observar uma diminuição da concentração de creatinina sérica (Gleich & Hartmann, 2009). Nestes animais pode ainda observar-se uma diminuição da relação albumina/globulina e da fracção das globulinas- α_2 (Miró et al., 2007). A maioria das anemias associadas a este vírus são não-regenerativas e são causadas pelos efeitos supressivos do vírus na medula óssea ao infectar as células precursoras das células hematopoiéticas (Hartmann, 2006). A incidência de anemia em gatos em virémia é muito elevada (Gleich & Hartmann, 2009). A anemia fracamente regenerativa secundária a linfomas, doenças mieloproliferativas e doenças imunossupressivas surgem vulgarmente associadas ao FeLV (Dunham & Granham, 2008). Estes animais também podem desenvolver anemias regenerativas, sendo 10% anemias hemolíticas imunomediadas induzidas pelo FeLV, uma vez que este induz a expressão do antigénio na superfície dos eritrócitos (Hartmann, 2006). Estas anemias regenerativas podem também ser devidas a infecções secundárias como a infecção por *Mycoplasma haemofelis* que se instala beneficiando da imunossupressão provocada pelo vírus ou por hemorragia devido à trombocitopénia induzida pelo FeLV (Hartmann, 2006). Esta trombocitopénia pode ocorrer secundariamente à diminuição da produção de plaquetas pela supressão da medula óssea causada pelo FeLV ou pela infiltração leucémica, pela infecção das plaquetas pelo vírus, e

também, porque os megacariócitos, que são células precursoras das plaquetas, são frequentemente alvo da infecção por FeLV (Hartmann, 2006). Pode também ocorrer trombocitopenia imunomediada que costuma estar associada a anemia hemolítica imunomediada (Hartmann, 2006). Estes animais podem apresentar também linfopenia que resulta principalmente da replicação do vírus no interior dos linfócitos (Hartmann, 2006). A anemia não regenerativa é muito comum nas infecções por FeLV-C. A incidência de neoplasias é mais elevada em gatos infectados por FeLV em comparação com gatos não infectados. Vários estudos sugerem que muitos gatos conseguem combater a viremia o que não impede o desenvolvimento posterior de neoplasias linfóides (Dunham & Granham, 2008). O linfoma é a neoplasia mais frequente nas infecções por FeLV, tem carácter maligno e afecta principalmente linfócitos T (Hardy, 1981); é classificado de acordo com o principal local envolvido e pode ser mediastinal, alimentar, multicêntrico ou extranodal (Nelson & Couto, 2006). Os linfomas multicêntricos são os mais associados ao vírus. Como o FeLV tem como tropismo células de divisão rápida, como as do epitélio intestinal, a enterite está muitas vezes presente em infecções persistentes por FeLV (Dunham & Graham, 2008). Uma grande variedade de alterações reprodutivas está também associada ao FeLV mas problemas dermatológicos não são comuns nesta infecção (Hartmann, 2011).

1.6. Infecções Virais Concomitantes

A maioria dos sinais clínicos associados a estas retroviroses (FIV e FeLV) deve-se às infecções concomitantes que se desenvolvem devido à imunodepressão causada pelos retrovírus (Collado et al., 2007; Hosie et al., 2009; Lutz et al., 2009). As principais afecções presentes nestes animais incluem infecções do tracto respiratório superior, infecções do tracto digestivo, patologias da cavidade oral, tais como: estomatites, gengivites e úlceras orais (Figura 3), micoplasmose hemotrópica, infecções oculares, entre outras (Doménech et al., 2011). A gengivo-estomatite crónica é causada geralmente por uma combinação de agentes víricos, como o FCV, FHV e Retrovírus, e bacterianos responsáveis por infecções secundárias (*Pasteurella*, *Streptococcus*, etc). O tratamento deve incluir limpeza profunda, eliminação do tártaro e extracção dos dentes em mau estado. Normalmente é necessária antibioterapia durante uma a duas semanas e analgesia (Collado, Doménech, Gómez-Lucía, Tejerico & Corrales, 2006). Os principais agentes virais responsáveis pela infecção do tracto respiratório superior incluem o Calicivírus felino (FCV) e o Herpesvírus felino (FHV) (Radford et al., 2009; Thiry et al., 2009).

Figura 3: Úlceras orais em gato FIV positivo pertencente à amostra populacional do presente estudo.



1.6.1. Calicivírus Felino (FCV)

O FCV é altamente contagioso e encontra-se distribuído pela população felina a nível mundial (Radford et al., 2009). A transmissão ocorre principalmente por via directa, nasal, oral ou conjuntival, no entanto este vírus também se transmite por via indirecta pois os viriões podem resistir no meio ambiente mais de 1 mês (Radford et al., 2009), podendo ser uma importante forma de disseminação em gatis onde há partilha de comedouros, bebedouros e camas. Depois do vírus entrar no organismo o primeiro local de replicação viral é a orofaringe (Radford et al., 2009) e passados 3 a 4 dias desenvolve-se uma virémia transitória. Este vírus é excretado predominantemente através das secreções oronasais durante a fase aguda da infecção. Depois de recuperarem da doença, cerca de 2 a 3 semanas após infecção, muitos animais podem continuar a excretar partículas virais durante vários anos (Radford et al., 2009). A prevalência de infecção é proporcional à densidade populacional, e em locais como gatis, esta infecção pode atingir prevalências muito elevadas, cerca de 25-40% (Bannasch & Foley, 2005; Helps et al., 2005). A sintomatologia clínica relacionada com a infecção por FCV pode incluir febre, aumento das secreções nasal e ocular, vesículas na língua, estomatite e pneumonia intersticial, sendo este vírus frequentemente detectado na cavidade oral de gatos imunodeprimidos (Radford et al., 2009).

1.6.2. Herpesvírus Felino (FHV)

A transmissão de FHV ocorre por via nasal, oral e conjuntival. Após entrada do vírus no organismo surge infecção no epitélio nasal e a subsequente disseminação para o saco conjuntival, faringe, traqueia e brônquios. A excreção viral ocorre principalmente pelas secreções oronasais e conjuntivais e inicia-se cerca de 24 horas após a infecção, podendo durar de 1 até 3 semanas (Thiry et al., 2009). É muito comum que a infecção por FHV se

torne crónica e latente e haja reactivações intermitentes onde há excreção de partículas virais infecciosas (Thiry et al., 2009). Em populações pequenas e saudáveis a prevalência da excreção deste vírus pode ser menor que 1%, no entanto em populações maiores, especialmente onde haja sintomatologia clínica, a prevalência pode estar acima de 20% (Binns et al., 2000; Helps et al., 2005). Em zonas com elevada densidade populacional, como gatis, o risco de contágio é acrescido (Pedersen et al., 2004). O FHV-1 apresenta tropismo para as células das amígdalas e da mucosa nasal e conjuntival e manifesta-se através de sintomatologia respiratória e ocular e o quadro clínico pode incluir cansaço, febre, espirros, secreções oculares e nasais, conjuntivites, queratites, úlceras da córnea; 80% dos animais expostos a esta infecção tornam-se portadores assintomáticos (Collado, 2006).

1.7. Diagnóstico

Os principais testes de diagnóstico utilizados em clínica na detecção de FIV e FeLV são baseados na técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*), que no caso do FIV pesquisa a presença de anticorpos contra o vírus e, no FeLV antígenios (Dunham & Granham, 2008). No diagnóstico de FeLV o ELISA detecta a presença da proteína da cápside (p27), que é produzida abundantemente na maioria dos gatos infectados e se encontra livre no plasma (Lutz et al., 2009). O teste é realizado em amostras de soro, plasma ou sangue total. Na fase de virémia inicial, mesmo antes da incorporação do material genético viral nas células da medula óssea, o resultado do teste é positivo (Cohn, 2007). Os gatos com resultados positivos podem passar a apresentar resultados negativos, se a infecção for combatida antes do vírus atingir a medula óssea (Hartmann, 2006; Cohn, 2007). Deste modo, os animais positivos ao teste ELISA devem ser retestados no mínimo 90 dias após o primeiro teste. O teste de imunofluorescência (IF) detecta a presença da p27 no citoplasma das células sanguíneas infectadas, nomeadamente leucócitos e plaquetas, utilizando-se para este efeito esfregaços de sangue total (Gomes-Keller et al., 2006; Cohn, 2007). Para além deste teste, existem outros como o isolamento viral e PCR (*Polimerase Chain Reaction*). O PCR é um método específico e sensível usado na detecção de provírus de FeLV presentes nas células, mesmo que o animal não se encontre em virémia (Hofmann-Lehmann et al., 2006). Através do PCR em Tempo Real é possível quantificar esta carga proviral assim como a carga viral plasmática (Tandon et al., 2005). Na fase de latência os animais não possuem antígenios em circulação, não se encontram em virémia, mas o vírus pode ser isolado a partir da medula óssea ou detectado enquanto provírus (Hofmann-Lehmann et al., 2006).

Nos testes para despiste de FIV é principalmente detectada a presença de anticorpos anti-FIV, dirigidos normalmente contra a proteína da cápside (p24) (Hartman, 2006; Levy et al., 2008). Os testes de diagnóstico incluem o ELISA, a Imunofluorescência e o Western Blot (Hosie et al., 2009). O teste ELISA pode apresentar resultados falsos-positivos assim como falsos-negativos. Os resultados falsos-negativos ocorrem na maioria das vezes devido a inexistência de níveis suficientes de anticorpos na amostra testada, o que se verifica em fases primárias da infecção, onde ainda não se desenvolveram anticorpos suficientes para testar positivo, ou fases tardias, quando a resposta imunitária do gato já se encontra demasiado comprometida para produzir anticorpos (Arjona et al., 2007; Cohn, 2007; Crawford & Levy, 2007). Os resultados falsos-positivos podem surgir em gatinhos que tenham recebido anticorpos maternos e não se encontrem verdadeiramente infectados. Gatos previamente vacinados testam como positivos à presença de anticorpos (Levy, Crawford & Slater, 2004; Arjona et al., 2007). O Western Blot é mais específico e mais sensível do que o ELISA, uma vez que detecta anticorpos que reagem com uma variedade de proteínas virais (Crawford & Levy, 2007). Existem ainda outros métodos de diagnóstico laboratorial como o isolamento viral e a detecção do ARN viral ou do ADN proviral por PCR (Bienzle et al., 2004; Johnson, 2005), sendo este último mais sensível relativamente aos outros métodos (Tandon et al., 2005).

1.8. Prevenção e Controlo

A identificação e separação dos gatos infectados são considerados os métodos mais eficientes na prevenção de infecções por FIV e por FeLV (Levy et al., 2008). Os animais infectados devem ser mantidos dentro de casa para evitar o contacto com outros animais, tanto para evitar a transmissão do FIV a animais sãos como para evitar a transmissão de outras doenças ao animal infectado que possam deteriorar o seu estado hígido, visto serem animais imunodeprimidos (Cohn, 2007; Hartmann et al., 2007). A realização do despiste de FIV e de FeLV em animais que serão introduzidos em ambientes com outros gatos é importante (Crawford & Levy, 2007; Hartmann et al., 2007). Na detecção de FIV é aconselhável que os gatos passem por um período de quarentena de 6 a 8 semanas, de modo a permitir que animais recentemente infectados desenvolvam níveis de anticorpos detectáveis (Hartmann et al., 2007). Existem actualmente vacinas contra o FIV e o FeLV, no entanto nenhuma é 100% eficaz na protecção e prevenção da infecção (Kirpensteijn, 2006; Hofmann-Lehmann et al., 2007; Cohn, 2007) e, como há riscos potenciais na sua administração, é importante avaliar caso a caso, se é vantajoso ou não proceder à vacinação (Hosie et al., 2009).

1.9. Prognóstico

Os gatos infectados pelo FIV, apesar de possuírem uma probabilidade mais elevada de desenvolver sinais clínicos, principalmente devido a infecções secundárias, imunomediadas e neoplásicas (Hosie et al., 2009), podem viver tanto tempo quanto os gatos não infectados, podendo usufruir de uma boa qualidade de vida (Kohmoto et al., 1998; Addie et al., 2000; Levy et al., 2006). O prognóstico no caso de infecção por FeLV é variável e geralmente menos favorável. A infecção pode permanecer em fase de latência durante vários anos, não apresentando o animal, sintomatologia clínica. Os animais sintomáticos apresentam prognóstico mais reservado. A maioria destes gatos morre devido a doenças degenerativas - anemia e imunodeficiência. Mas em animais mais velhos, a morte deve-se geralmente ao desenvolvimento de neoplasias hematopoiéticas (Langhammer, Fiebig, Kurtf & Denner, 2005). Os gatos co-infectados com ambos os vírus apresentam um prognóstico menos favorável, pois os tropismos parcialmente sobreponíveis podem levar à infecção de todas as linhas hematopoiéticas e células linfóides (de Mari et al., 2004).

1.10. Tratamento

O tratamento das doenças retrovirais baseia-se, normalmente, em terapia sintomática e de suporte, como fluidoterapia quando necessário, quimioterapia no caso de neoplasias, controlo de infecções secundárias com antibióticos, fármacos antiparasitários, antifúngicos, entre outros (Doménech et al, 2011). O diagnóstico preciso e precoce das afecções concomitantes em curso é essencial para a instituição de uma terapêutica bem sucedida (Hartmann et al., 2007). Muitas das infecções secundárias presentes nestes animais respondem bem a terapias convencionais, no entanto é por vezes necessário um tratamento mais prolongado (Cohn, 2007). Animais com anemia não-regenerativa podem beneficiar de transfusões sanguíneas assim como de eritropoietina recombinante humana (Rh-EPO), se bem que seja importante descartar a presença de *Mycoplasma haemofelis* (Hartmann et al., 2007). Em animais com leucopénia pode ser levado em consideração o uso de factor de estimulação de colónias de granulócitos (G-CSF) (Hartmann, 2006). A sintomatologia oral, muito comum nestes animais, requer muitas vezes um tratamento prolongado e a utilização de doses altas de antibióticos e antifúngicos, se as lesões primárias forem causadas pela proliferação de bactérias ou fungos, respectivamente (Hartmann, 2004).

1.10.1. Terapia com Indutores de Interferão e Imunomoduladores

Os imunomoduladores e os indutores da produção de interferão são amplamente utilizados na terapia de animais com FIV e/ou FeLV e tem sido sugerido que o seu uso melhora a função do sistema imunológico permitindo assim ao animal controlar a carga viral e recuperar da doença (Doménech et al., 2011). No entanto, há poucos estudos que comprovem os benefícios destes fármacos e, em algumas situações, uma estimulação não específica do sistema imunológico pode ser contra-indicada, porque pode promover um aumento da replicação viral por activação de linfócitos e macrófagos infectados (Hosie et al., 2009).

A Proteína A do *Staphylococcus* (SPA[®], da Sigma) tem como objectivo estimular a actividade dos linfócitos T citotóxicos e do interferão- γ (IFN- γ) (Liu, Good, Trang, Engelman, & Day, 1984). O seu efeito benéfico não está completamente comprovado (McCaw et al., 2001). É utilizada na dose de 10 μ g/Kg, via intraperitoneal (IP), duas vezes por semana (Cohn, 2007).

O *Acemannan* (Carrisyn[®], Carrington Laboratories, Estados Unidos da América) é um polímero de um hidrato de carbono complexo, derivado da planta *Aloe vera* (de Mari et al., 2004) que induz os macrófagos a produzirem o factor de necrose tumoral- α (TNF- α), o INF- γ , IL-1 e IL-6 e estimula a produção de anticorpos específicos (Yates et al., 1992; Chow, Williamson, Yates, & Goux, 2005). É utilizado na dose de 2 mg/Kg, IP, uma vez por semana, durante 6 semanas (Sheets, Unger, Gingleman, & Tizard, 1991).

1.10.2. Terapia Antiviral

A terapia antiviral tem como função o combate directo da infecção viral. A administração de fármacos antivirais como tratamento de retroviroses felinas é relativamente incomum (Hartmann, 2006; Sellon & Hartmann, 2006; Dunham & Graham, 2008). A maioria destes fármacos utilizados são licenciados para medicina humana e, por esse motivo, não estão aferidas doses nem estabelecidos protocolos para uso veterinário, para além da toxicidade e efeitos secundários indesejáveis que podem originar nos animais (Caney, 2005; Hartmann, 2006; Sellon & Hartmann, 2006). Estes fármacos incluem o AZT (Zidovudina- Retrovir[®]), Ribavirin (Rebetol[®]), Zalcitabine (HIVID[®]) e Foscarnet (Foscavir[®]), e podem ser utilizados isoladamente ou em associação (Doménech et al., 2011).

O AZT (zidovudina - Retrovir[®], da Glaxo-Wellcome) é um análogo de nucleósidos que bloqueia a transcriptase reversa dos retrovírus. Tem sido demonstrado que este fármaco reduz a replicação viral *in vitro* e *in vivo*, que pode reduzir a carga viral plasmática e melhorar o

estado imunológico e clínico dos gatos com retrovírus felinas (Hartmann et al., 1999). A dose é de 50-100mg/kg por via oral (PO) de 12 em 12 horas ou por administração subcutânea. A anemia não-regenerativa é um efeito secundário comum, principalmente nos tratamentos que usam as doses mais elevadas, e por isso, durante o tratamento devem ser monitorizados parâmetros hematológicos (Hosie et al., 2009). Esta terapia não deve ser instituída em animais com supressão da medula óssea. Há subtipos de FIV que mostram resistência a esta terapia. Os efeitos secundários associados a esta terapêutica podem ser atenuados pela associação do AZT a factores de crescimento hematopoiético, como GM-CSF, e à Rh-EPO (Arai, Darden, Lewis & Yamamoto, 2000; Arai, Earl & Yamamoto, 2002).

A utilização de hormonas sexuais também tem sido estudada como terapia antiretroviral. Elevados níveis de progesterona e de 17 β -estradiol modulam a síntese de proteínas virais, aumentando especificamente a síntese da proteína da cápside, mas diminuem o número de partículas infecciosas libertadas, possivelmente através da indução de mecanismos de apoptose das células infectadas (Tejerizo et al., 2005).

O AMD3100 pertence a uma nova classe de *bicyclams* que actuam como antagonistas selectivos do receptor CXCR4, utilizado pelo FIV como co-receptor celular. Por este motivo estes fármacos podem provocar uma inibição da entrada do vírus nas células (Willet, Hosie, Neil, Turner & Hoxie, 1997; Richardson et al. 1999; Egberink et al. 1999; Frey, Hoover & Mullins, 2001). Apesar de não estar licenciado como composto antiviral, num estudo controlado efectuado a 40 gatos naturalmente infectados por FIV, os animais tratados com este fármaco (0,5mg/Kg de 12 em 12 horas durante 6 semanas com administração subcutânea) mostraram melhorias dos sinais clínicos e diminuição da carga viral sem efeitos secundários (Hartmann et al., 2006).

A inexistência de um tratamento eficaz e seguro contra o FIV e o FeLV torna importantes os tratamentos alternativos como o uso de imunomoduladores mais específicos, particularmente os interferões tipo I que possuem efeitos anti-virais (Collado et al., 2006; Doménech et al., 2011).

1.10.3. Interferão

O interferão (IFN) foi descoberto como agente antiviral em 1957 (Samuel, 2001). Têm sido feitos progressos consideráveis desde então na compreensão da constituição, funcionamento e efeitos do sistema interferão (SIFN) na interacção vírus-hospedeiro. Os IFNs são

glicoproteínas de baixo peso molecular sintetizadas por múltiplos tipos celulares, principalmente do sistema imunitário (SI) (Collado et al., 2006), que activam as defesas deste na tentativa de erradicação dos agentes patogénicos. O SIFN inclui células que sintetizam e libertam IFN em resposta a uma infecção viral e células, normalmente adjacentes e não infectadas, que possuem receptores à superfície (Mogensen, Lewerenz, Reboul, Lutfalla & Uzé, 1999) que respondem ao IFN com acções antivirais (Pestka, Krause & Walter, 2004; Radford, 2006). Os IFNs têm um vasto leque de acções biológicas como a regulação do ciclo celular, diferenciação, apoptose e a modulação da resposta imunológica (Samuel, 2001). Acredita-se que os interferões desempenham o papel principal na resposta contra muitas retrovírus tais como: HIV (Shirazi & Pitha, 1992), vírus T-linfotrópico humano - HTLV (Feng, Heyden & Ratner, 2003; Feng, 2008) e o vírus da leucemia murina - MuLV (Aboud, Kimchi, Bakhanashvili & Salzberg, 1981; Gerlach et al., 2009). Nas infecções retrovirais o IFN pode actuar nas fases iniciais ou finais do ciclo de replicação viral (Collado et al., 2006). Actualmente conhecem-se dois tipos de interferão: tipo I, que inclui entre outros o IFN- α , IFN- β e IFN- ω , e tipo II que inclui o IFN- γ (Pestka et al., 2004). Os IFNs do tipo I exibem uma actividade antiviral e antiproliferativa, enquanto que os IFN do tipo II têm uma função principalmente imunomoduladora (Collado et al., 2007). Os diferentes interferões são produzidos por diferentes células: os leucócitos produzem IFN- α , os fibroblastos IFN- β , os trofoblastos IFN- ω e os linfócitos T activados (linfócitos T auxiliares CD4⁺ e linfócitos T citotóxicos CD8⁺) e células NK (*Natural Killer*) IFN- γ (Collado et al., 2007; Doménech et al., 2011). Os IFNs interagem com diferentes receptores celulares, tendo como resultado efeitos biológicos distintos tais como: reduzir a velocidade de proliferação das células infectadas; reduzir as alterações estruturais e funcionais das células infectadas; induzir a síntese de proteínas que activam endonucleases, as quais degradam o ARNm viral. Os IFNs tipo I parecem partilhar o mesmo receptor celular, constituído por duas sub-unidades, o IFNAR-1 e IFNAR-2 (Samuel, 2001). O IFN- γ usa um receptor distinto mas também constituído por duas sub-unidades denominadas IFNGR-1 e IFNGR-2. Os linfócitos contêm receptores funcionais para IFN- ω , enquanto uma grande variedade de células respondem a sinais de IFN- α , IFN- β , e IFN- γ (Collado et al., 2007). Os IFNs tipo I induzem respostas imunes anti-proliferativas, anti-inflamatórias, imunomoduladoras e antivirais não desempenhando apenas um papel importante na resposta inata mas influenciando também a resposta imune adquirida (Collado et al., 2007; Gerlach et al., 2009). O primeiro mecanismo afectado por este sistema é a síntese de proteínas virais (Samuel, 2001). No entanto, há vírus, como é o caso de alguns retrovírus, que parecem ser inibidos apenas nos últimos estádios da sua multiplicação (Samuel, 2001). Um grande leque de diferentes vírus de ADN e ARN são inibidos pelo SIFN tanto *in vitro*

como *in vivo*. Após a sua administração, o IFN liga-se aos receptores específicos de uma grande variedade de células, alterando, supostamente, o mecanismo de replicação viral, por destruição do ARNm e inactivação das proteínas de transcrição (sintetase 2'5' oligoadenilato) (Samuel, 2001). Devido à sua capacidade antivírica, os IFNs são empregues há algum tempo na clínica de animais de companhia. São utilizados principalmente o interferão alfa recombinante humano (rHuIFN- α) e o interferão ómega recombinante felino (rFeIFN- ω) (Collado et al., 2006). Estes interferões mostraram eficácia no tratamento de gatos com FIV e com FeLV e têm sido propostos para o tratamento destas infecções isolados (Müller, 2002; Riondato, Gianella, Guglielmino, Cagnasso & Bo, 2003; de Mari et al., 2004) e, por vezes, em associação com AZT (Hoover, Zeidner & Mullins, 1990; Zeidner et al., 1990). No entanto, não está completamente esclarecido se apenas melhoram a resposta imune enquanto imunomoduladores ou se têm algum efeito directo sobre a expressão viral (Collado et al., 2007). Geralmente a maioria dos estudos relacionados com a aplicação dos IFNs têm mostrado que a síntese das proteínas retrovirais não é afectada sugerindo que estes actuam nos últimos estágios do ciclo viral, impedindo a montagem correcta do vírus ou a libertação de partículas virais (Gómez-Lucía et al., 2009). É ainda de referir que existem vários estudos que demonstram que os interferões, apesar de partilharem uma actividade antiviral, um receptor e uma elevada homologia tanto na sequência de aminoácidos como na estrutura, as suas acções parecem não ser redundantes (Gerlach et al., 2009).

1.10.3.1. Interferão Alfa Humano (rHuIFN- α)

O interferão alfa humano (rHuIFN- α) (Roferon[®]-A, Roche; Intron[®]-A, Schering Plough II) é de origem humana e obtido a partir da tecnologia de ADN recombinante, sendo normalmente administrado a gatos por via oral (Collado et al., 2007). Este fármaco promove um aumento da resposta imunitária face às infecções virais através da activação de importantes citocinas como a IL-1, IL-5, IL-6, IL-8 e o factor de estimulação de colónias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF); aumenta a sobrevivência dos linfócitos T CD4⁺ e o número de linfócitos T CD8⁺; estimula a actividade dos linfócitos T, dos macrófagos e das células NK (Pedretti et al., 2006). Existem dois regimes terapêuticos: administração de alta dose (104-106 UI/Kg SID) por via subcutânea (SC) durante 1 mês, e de baixa dose (1-50 UI/Kg SID) por via oral (PO) durante 7 dias, seguidos de 7 dias de pausa, alternadamente durante 6 meses. Quando administrado em altas doses melhora a condição clínica dos animais, induzindo uma resposta humoral mais efectiva, no entanto a sua administração está limitada a um máximo de 6-7 semanas, altura em que o animal começa a produzir anticorpos contra o fármaco (Zeidner et al. 1990). A terapêutica oral com doses baixas aumentou significativamente o tempo de

vida dos gatos FIV positivos e provocou uma melhoria clínica, mas não mostrou alterações a nível da virémia nem na carga proviral (Pedretti et al., 2006). Em gatos FeLV positivos, à semelhança do que se passa com o FIV, doses baixas demonstraram aumentar o tempo de vida e melhorar clinicamente os animais quando em comparação com animais tratados com *placebo* não mostrando qualquer efeito na redução das cargas virais (Pedretti et al., 2006). Apesar dos benefícios clínicos que resultavam da aplicação do rHuIFN- α , os gatos infectados tanto por FIV quanto por FeLV tornavam-se persistentemente virémicos ou tiveram uma redução da replicação viral somente durante o período de tratamento (Pedretti et al., 2006; Doménech et al., 2011). Baixas doses de rHuIFN- α são ineficazes relativamente à depleção dos linfócitos, sem variações relevantes na relação de linfócitos T CD4⁺/CD8⁺ durante o tratamento de gatos naturalmente infectados por FeLV (Riondato et al., 2003; Pedretti et al., 2006; Doménech et al., 2011). Este interferão também já se mostrou benéfico no tratamento de infecções por FHV e por FCV (Fulton & Burge, 1985). O estudo onde houve cultura de células epiteliais da córnea de felinos, comprovou que o rHuIFN- α não apresenta citotoxicidade numa concentração de 10^2 a 10^6 UI/ml, e que em concentrações de 10^5 UI/ml reduz significativamente a citopatogenicidade e as cargas virais de FHV-1 (Sandmeyer, Keller & Bienzle, 2005).

1.10.3.2. Interferão Ómega Felino (rFeIFN- ω)

O interferão ómega recombinante de origem felina (rFeIFN- ω – Virbagen[®] Omega, Virbac) é produzido por tecnologia de ADN recombinante. Este medicamento tem duas apresentações comerciais: Virbagen Omega 5UM (unidades por milhão) e Virbagen Omega 10UM, ambos para caninos e felinos. Este produto consiste numa fracção liofilizada (*pellet* liofilizado) que contém a substância activa (interferão ómega recombinante de origem felina) e solvente para obtenção da suspensão injectável. Este composto está indicado para a redução da mortalidade e dos sinais clínicos de parvovirose (forma entérica) em cães a partir de 1 mês de idade e para tratamento de gatos infectados com FIV e/ou FeLV, em estágio clínico não terminal, a partir das 9 semanas de idade. O rFeIFN- ω pode provocar reacções adversas, 3 a 6 horas após a administração tais como hipertermia, vómitos de carácter transitório, fezes moles ou mesmo diarreia ligeira e fadiga durante o tratamento, podendo ainda provocar uma ligeira diminuição dos leucócitos, das plaquetas e dos eritrócitos e um aumento na concentração da alanina aminotransferase (AST) (Müller, 2002). Estes sintomas podem desaparecer ao fim de 1 semana após a última injeção. Não existe informação disponível sobre uma possível indução de efeitos indesejáveis a longo prazo em cães e gatos, nomeadamente perturbações auto-imunes. Essa possibilidade não pode, portanto, ser excluída e deve ser ponderada como um

risco face à infecção por FIV e/ou FeLV. Collado et al. (2007) compararam o efeito do rHuIFN- α e do rFeIFN- ω em células felinas persistentemente infectadas por FeLV, demonstrando que o rFeIFN- ω afecta o ciclo do FeLV ao nível pós-transcricional. A actividade da transcriptase reversa (RT), utilizada para estimar o número de partículas infecciosas, decresce segundo a dose, observando que o rFeIFN- ω parece ter cerca de 50-90 vezes mais potência do que o rHuIFN- α na inibição de RT. Adicionalmente os estudos revelam que ambos os IFNs induzem um decréscimo da viabilidade das células infectadas por FeLV, aumentando a apoptose destas (Collado et al., 2007). No caso da infecção por FIV, a aplicação de rHuIFN- α e de rFeIFN- ω , em células felinas mostram resultados semelhantes aos obtidos em FeLV (Tanabe & Mamamoto, 2001). Os resultados sugerem ainda que rFeIFN- ω é 25 vezes mais eficiente do que o rHuIFN- α na inibição de RT em FIV (Collado et al., 2007). Os gatos co-infectados com FIV e FeLV apresentaram algumas melhorias após a administração de 1MU/Kg/dia, via SC, durante 5 dias consecutivos, em três séries: dia 0 a dia 4, dia 14 a dia 18 e dia 60 a dia 64 (Lanore, 2004; de Mari et al., 2004; Cohn, 2007). Segundo de Mari et al. (2004), tanto animais FeLV positivos, como animais co-infectados por FIV e por FeLV apresentam uma diminuição da taxa de mortalidade e melhorias ao nível clínico quando sujeitos a esta terapêutica. Geralmente gatos com anemia no início do tratamento que não mostrem melhoria ao dia 14 têm uma menor probabilidade de responderem bem ao tratamento (de Mari et al., 2004). Ainda neste estudo não foram observadas reacções secundárias adversas atribuíveis à aplicação de rFeIFN- ω (de Mari et al., 2004). O tratamento com este fármaco parece ser mais eficaz quando administrado no início da doença (Radford, 2006). A eficácia do produto em gatos com a forma tumoral da infecção por FIV e ou FeLV nos estágios terminais, não foi ainda devidamente testada (Lanore, 2004). O rFeIFN- ω também se mostrou benéfico no tratamento de infecções por FHV e FCV (Fulton & Burge, 1985). Num estudo realizado em França, onde se administraram 2 gotas de solução de rFeIFN- ω (0,5 ml de rFeIFN- ω com 9,5 ml de NaCl a 0,9) em cada olho infectado por FHV, 5 vezes ao dia durante 20 dias, mostrou melhorias clínicas significativas (Verneuil, 2004). Um estudo na Alemanha conclui que é recomendada a utilização de rFeIFN- ω juntamente com vitaminas, dieta específica, antibióticos no tratamento de gengivoestomatites crónicas e em casos mais graves é por vezes necessário repetir o tratamento passados 2-6 meses (Mihaljevic, 2003). *In vitro* este interferão inibe a replicação viral de FeLV, no entanto são necessários mais estudos que demonstrem o seu carácter antiviral (anti-FIV e/ou anti-FeLV) e não apenas a inibição de infecções secundárias (Lutz et al., 2009).

MATERIAL E MÉTODOS

1. Desenho Experimental

O estudo para a avaliação do efeito terapêutico do interferão ómega recombinante de origem felina (rFeIFN- ω) em gatos naturalmente infectados com FIV e/ou FeLV, de acordo com protocolo de tratamento licenciado para o medicamento, foi realizado com base num conjunto de exames clínicos e laboratoriais realizados ao dia 0, 10, 30 e 65 após o início da terapêutica em estudo (hemogramas, proteinogramas, parâmetros bioquímicos, carga de provírus de FeLV e excreção de Calicivírus Felino (FCV) e de Herpesvírus Felino tipo 1 (FHV-1)).

2. Amostra Populacional

Este estudo foi realizado numa população de gatos errantes, adultos, sem idade definida e de raça Europeu Comum, alojados na União Zoófila de Lisboa (U.Z.L.). Os animais estudados encontravam-se naturalmente infectados por FIV (FIV⁺), FeLV (FeLV⁺) ou por ambos os vírus (FIV/FeLV⁺). Neste gatil, após recepção dos animais é efectuado o despiste de FIV e de FeLV, através de um teste rápido de imunocromatografia. Os gatos infectados são separados fisicamente dos gatos não infectados (FIV e FeLV negativos) e alojados em dois gatis: gatil de FIV e gatil de FeLV. Encontravam-se nestas condições, de acordo com as indicações da U.Z.L., 23 gatos (10 FIV⁺ e 13 FeLV⁺ e/ou FIV/FeLV⁺) que constituiriam a amostra populacional do presente estudo. No entanto esta foi posteriormente reduzida a 16 gatos (10 machos e 6 fêmeas) após confirmação laboratorial da positividade dos gatos a ambos os vírus, através de um teste mais sensível e específico que o realizado na U.Z.L., e se concluir que 2 dos 10 gatos FIV⁺ eram FIV e FeLV negativos, 1 gato FIV⁺, 3 FeLV⁺ e 1 FIV/FeLV⁺ terem sido adoptados, já após a primeira colheita de amostras. Assim, passaram a constituir a amostra 7 gatos FIV⁺ (5 machos e 2 fêmeas), 6 gatos FeLV⁺ (4 machos e 2 fêmeas) e 3 co-infectados FIV/FeLV⁺ (1 macho e 2 fêmeas). Todos os gatos da amostra cumpriam os critérios de inclusão referidos em Karine de Mari et al. (2004) que incluíam: animais de qualquer idade, raça, género; apresentarem pelo menos um sinal clínico potencialmente relacionado com FIV ou FeLV; tenham sido positivos a testes ELISA (rápidos) para FIV e/ou FeLV; e ao mesmo tempo, não apresentarem nenhum dos critérios de exclusão, ou seja, possuírem outra doença associada (linfoma ou leucemia linfóide), estarem em fase terminal de doença ou a ser tratados com imunomoduladores e ainda aos quais não tenha sido efectuado o protocolo completo de tratamento referido no estudo. A cada um dos gatos que integrou a amostra foi atribuído um número (1 a 16), para simplificar a sua identificação (Tabela 1).

Tabela 1: Identificação numérica dos gatos da amostra populacional.

Gatos FIV ⁺	Gatos FeLV ⁺	Gatos FIV/FeLV ⁺
Gato 1- Jerry	Gato 8- Ervilha	Gato 14- Simba
Gato 2- Dylan	Gato 9- Tremoço	Gato 15- Nikky
Gato 3- Faustino	Gato 10- Nino	Gato 16- Jackeline
Gato 4- Ezequiel	Gato 11- Chocolate	
Gato 5- Mini-Marta	Gato 12- Jolie	
Gato 6- Marilyn	Gato 13- Pretinho	
Gato 7- Preto		

3. Plano de Tratamento

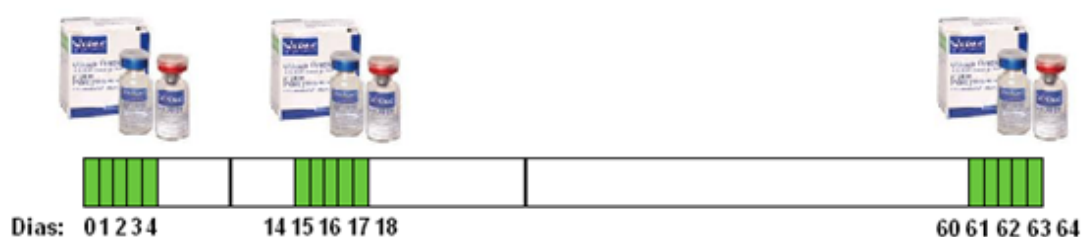
A terapia administrada consistiu em interferão ômega recombinante de origem felina (rFeIFN- ω - Virbagen[®] Omega, Virbac) (Figura 4).

Figura 4: Virbagen[®] Omega



O produto foi administrado, por via subcutânea, 1 vez por dia, durante 5 dias consecutivos de acordo com o protocolo licenciado, tendo sido realizados três tratamentos distintos de 5 dias cada, iniciados no dia 0, 14 e 60 (Figura 5). A dose foi de 1 MU/Kg de peso vivo.

Figura 5: Dias de administração do rFeIFN- ω nos 3 tratamentos realizados.



4. Plano de Colheita das Amostras

Realizaram-se colheitas de material biológico (sangue e zaragatoas oronasais e rectais) a cada um dos 16 animais da amostra populacional nos dias: zero (dia 0), primeiro dia da aplicação do rFeIFN- ω ; ao dia dez (dia 10); dia trinta (dia 30) e dia sessenta e cinco (dia 65) após início

do tratamento (Figura 6).

Figura 6: Dias de administração de rFeIFN- ω (a verde) e das colheitas das amostras (a preto).



Os animais foram tranquilizados com butorfanol (Dolorex[®], Intervet), na dose de 0,1 mg/Kg de peso vivo por via intramuscular (IM). O sangue foi colhido através de punção da veia jugular. Recolheram-se 0,5 ml de sangue para um tubo seco, 0,5 ml para tubo com heparina e 2,5 ml para tubo com EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético). Foram igualmente colhidas amostras biológicas da cavidade oronasal e rectal através de zaragatoas estéreis. No presente trabalho apenas as colheitas da cavidade oronasal foram consideradas para avaliação.

5. Exame Clínico

Nos dias das colheitas de amostras realizaram-se exames clínicos a todos os animais que permitiram avaliar a evolução clínica de cada um durante o tratamento com rFeIFN- ω , tendo sido registados os resultados da avaliação relativos aos parâmetros: estado da cavidade oral (presença e grau de gengivites, úlceras orais, granulomas orais e faucite); alterações oftalmológicas; linfadenopatia; presença de corrimentos anómalos (ocular e nasal); estado da pelagem; cor das mucosas; condição corporal; aparência fecal e existência de comorbilidades. Adoptou-se uma escala para que a avaliação fosse a mais objectiva possível. A cada parâmetro avaliado em exame clínico foi atribuída uma classificação de zero a dois [0-2], consoante a ausência (valor 0), presença ligeira a moderada (valor 1) e de moderada a severa (valor 2), do parâmetro em análise (Tabela 2). Na avaliação da condição corporal, utilizou-se uma escala com 6 níveis. Os níveis 1 e 2 da escala foram atribuídos a um animal muito magro (caquético) e magro, recebendo na classificação do exame clínico o valor dois (2); o nível 3 indica animal ligeiramente magro correspondendo a uma classificação de um (1); os níveis 4, 5 e 6 da escala da condição corporal referem-se, respectivamente a animais de peso ideal, peso superior ao normal e obeso, atribuindo-se-lhes, aqui, o valor de zero (0) (Tabela 2). No final, cada animal possuía uma pontuação total correspondente ao seu quadro

clínico para esse dia, que resultava da soma das classificações obtidas nos diversos parâmetros avaliados no exame clínico. A comparação das classificações ao longo do estudo experimental, permitiu avaliar a evolução clínica dos animais durante o tratamento com rFeIFN- ω .

Tabela 2: Parâmetros avaliados no exame clínico e respectivas classificações.

Parâmetros Clínicos	Classificação
Úlceras orais/ Gengivite	Sem evidência de lesões bucais: 0 Pouco exuberante mas presente e/ou algum tártaro dentário: +1 Muito exuberante e/ou tártaro dentário abundante: +2
Granulomas orais/Faucite	Sem evidências clínicas: 0 Presente/discreta hiperémia: +1 Presença exuberante: +2
Conjuntivite/ Alterações oftalmológicas	Sem evidências clínicas: 0 Hiperémia da conjuntiva discreta/Conjuntivite unilateral/Queratite ligeira ou crônica: +1 Hiperémia da conjuntiva moderada a grave/ Conjuntivite bilateral/ queratite activa: +2
Linfadenomegália	Sem evidência clínica: 0 Evidente/ localizada: +1 Muito evidente/ generalizada: +2
Corrimento ocular	Sem evidências clínicas: 0 Corrimento seroso (uni/bilateral): +1 Corrimento mucopurulento (uni/bilateral): +2
Corrimento nasal	Sem evidências clínicas: 0 Corrimento seroso (uni/bilateral): +1 Corrimento mucopurulento (uni/bilateral): +2
Mucosas pálidas	Sem evidência clínica: 0 Mucosas ligeiramente pálidas: +1 Mucosas com palidez severa: +2
Pêlo seco/ Seborreia	Sem evidências clínicas: 0 Presença ligeira de ambas as condições: +1 Presença exuberante de ambas as condições: +2
Condição corporal	Obeso (6/6): 0 Peso acima do normal (5/6): 0 Peso ideal (4/6): 0 Ligeiramente Magro (3/6): +1 Magro (2/6): +2 Caquético (1/6): +2

Tabela (Continuação): Parâmetros avaliados no exame clínico e respectivas classificações.

Consistência fecal	Normal: 0 Diarreia: +1 Diarreia muito exuberante: +2
Palpação abdominal	Sem alterações: 0 Alterações ligeiras: +1 Alterações exuberantes: +2
Co-morbilidades evidentes ao exame clínico	Sem evidências clínicas: 0 Presença de co-morbilidades: +1 Fraqueza e prostração muito evidentes/ animal muito inactivo: +2

6. Processamento das Amostras em Laboratório

Para melhor avaliar os efeitos terapêuticos do rFeIFN- ω foram realizados hemogramas e proteinogramas, determinadas as concentrações séricas de ureia e creatinina, para avaliação da função renal, e de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), para avaliação da função hepática. No que respeita aos proteinogramas foram medidas as concentrações de albumina, globulina alfa 1 (globulina- α 1), globulinas alfa 2 (globulina- α 2), globulina beta (globulina- β), globulina gama (globulina- γ) e proteínas totais (PTs). Foi ainda determinada a relação albumina/globulina (Rel A/G). Os hemogramas e as análises bioquímicas foram realizados no Laboratório de Análises Clínicas Dr. Braço Forte da FMV/UTL e os proteinogramas no Laboratório DNATech. O hemograma foi efectuado a partir do sangue total, as análises bioquímicas do sangue heparinizado e os proteinogramas a partir do soro. O processamento das restantes amostras realizou-se no Laboratório de Virologia e Biologia Molecular da FMV/UTL. As amostras de sangue foram previamente centrifugadas durante 5 minutos a 2000 g para separação do plasma. As amostras de material biológico da cavidade oronasal foram suspensas em solução salina fosfatada (PBS) e centrifugadas durante 10 minutos a 4000 g. As determinações de anticorpos anti-FIV e antigénio de FeLV foram efectuadas por ELISA. Foi realizada a extracção de ADN proviral presente nas células sanguíneas e este foi amplificado por PCR em Tempo Real com o propósito de se determinar a variação da carga de provírus de FeLV. A partir das amostras de material biológico da cavidade oronasal fez-se a extracção simultânea de ARN e ADN. O material extraído foi posteriormente amplificado por RT-PCR e PCR em Tempo Real com o objectivo de avaliar a variação na excreção de Calicivírus Felino (FCV) e Herpesvírus Felino tipo 1 (FHV-1), respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3: Procedimentos realizados no laboratório a partir das amostras de sangue e de material biológico da cavidade oronasal.

Vírus	Amostra	Despiste FIV e FeLV	Extracção Ácido Nucleico	PCR	Electroforese
FIV	Sangue	Detecção de Ac (ELISA)			
FeLV	Sangue	Detecção de Ag (ELISA)	Extracção de ADN	qPCR em Tempo Real	
FHV-1	Material C.Oronasal		Extracção de ADN	qPCR em Tempo Real	
FCV	Material C.Oronasal		Extracção de ARN	RT-PCR	Electroforese em gel de agarose

Legenda: Ac - Anticorpos; Ag - Antigénios.

6.1. Detecção de Anticorpos de FIV

O diagnóstico laboratorial do FIV foi efectuado com o teste comercial ViraCHEK[®]/FIV (Synbiotics Corporation), baseado na técnica de ELISA Indirecto, para detectar a presença de anticorpos anti-FIV (anti p24) no plasma dos animais. O desenvolvimento de cor azul indica a presença de anticorpos anti-FIV e, na ausência destes, não é observada nenhuma mudança de cor, ficando o poço incolor. Este teste foi realizado à totalidade dos animais inicialmente em estudo. A técnica foi efectuada de acordo com as instruções do fabricante e os resultados foram interpretados e registados na altura.

6.2. Detecção de Antigénios de FeLV

O diagnóstico do FeLV foi realizado com o teste ViraCHEK[®]/FeLV (Sinbiotic Corporation), baseado na técnica ELISA para detecção da presença da proteína da cápside viral p27 presente em circulação nos gatos com FeLV. O desenvolvimento de cor azul indica a presença de antigénios de FeLV e, na ausência destes, não é observada nenhuma mudança de cor, ficando o poço incolor. Este teste foi realizado à totalidade dos animais inicialmente em estudo. A técnica foi efectuada de acordo com as instruções do fabricante e os resultados foram interpretados e registados na altura.

6.3. Extracção de Ácido Nucleico

6.3.1. Extracção de ADN

A partir do sedimento celular, obtido pela centrifugação efectuada às amostras de sangue total, foi extraído ADN proviral com o auxílio do *kit* Qiam[®] MinElute Virus Spin (Qiagen). A técnica foi realizada de acordo com as instruções do fabricante e o ADN extraído foi armazenado a -80°C até ser novamente processado.

6.3.2. Extracção Simultânea de ADN e ARN

O ADN e ARN viral foram extraídos simultaneamente a partir da suspensão das amostras de material da cavidade oronasal em PBS, com o auxílio do *kit* QIAamp[®] Viral RNA minikit (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Os ácidos nucleicos extraídos foram armazenados a -80°C até serem novamente processados.

6.4. RT-PCR e PCR em Tempo Real

Todas as amostras foram processadas em PCR usando diferentes protocolos de acordo com o vírus que se pretendia pesquisar. Antes de realizar o PCR fez-se a quantificação de ácidos nucleicos presentes nas amostras extraídas, por espectrofotometria na absorvância de 260nm (NanoDrop 2000c, da Thermo Scientific).

6.4.1. Calicivírus Felino (FCV)

A pesquisa de FCV foi realizada por *One step* RT-PCR (Tabela 6). A amplificação realizou-se num volume final de 25µl com a *mix* FideLiTaq RT-PCR Master Mix (GE Healthsciences), 20 ng de ARN viral e 50µM de *primer forward* e *reverse* dirigidos para o gene VP2 do vírus (Tabela 4) (Wilhelm et al., 2006). Para validação dos resultados foram utilizados como controlos positivos a vacina Fevaxyn[®] Pentofel, da Pfizer, com a estirpe 255 do FCV inactivada, e uma amostra positiva, amavelmente fornecida pelo serviço de Virologia do Laboratório Nacional de Investigação Veterinária. Para excluir a possibilidade de contaminação foram realizados controlos negativos, através da adição de água em vez do ARN. A visualização do produto resultante do RT-PCR foi efectuada após electroforese em gel de agarose a 2% em TAE (Tris-Acetato-EDTA) na presença do corante GelRed[™] (Biotium), na concentração de 2,5µl/100ml de agarose, no aparelho MasterImage[®] VDS (Pharmacia Biotech).

6.4.2. Herpesvírus Felino Tipo 1 (FHV-1)

Para a quantificação das cargas virais de FHV-1, foi utilizado o PCR em Tempo Real com a metodologia TaqMan[®] no aparelho 7300 Real Time PCR[®] (Applied Biosystems) (Tabela 6). Foi utilizada, para além dos *primers* específicos (Tabela 4), uma sonda marcada na extremidade 5' com um *quencher* e na extremidade 3' com um *reporter* (TaqMan[®]), dirigidos para uma região genómica, incluída no gene da timidina quinase viral (Tabela 5). A detecção da amplificação é devida à emissão de fluorescência do *reporter* devido à deslocação da sonda pela actividade da enzima exonuclease 5'-3' da DNA polimerase. A amplificação é seguida visualmente em gráficos (sinais de fluorescência versus números de ciclos) permitindo monitorizar, em tempo real, a cinética da reacção de amplificação. A reacção foi realizada no volume final de 20 µl, com tampão de reacção TaqMan[®] (Gene Expression Master Mix[™]), 2x 900nM de cada *primer*, 250nM de sonda TaqMan[®] e 20 ng de ARN viral. O controlo positivo utilizado foi um plasmídeo recombinante pGEM-FHV-1 (Laboratório de Virologia da FMV), que inclui a região a amplificar (Sykes et al., 2001). Este controlo foi diluído serialmente na base 10 (10^{-1} - 10^{-6}) de forma a gerar uma curva padrão constituída por estes seis pontos. O valor Ct (*threshold cycle*) para cada amostra foi determinado como o número do ciclo no qual a fluorescência emitida ultrapassou o limite de detecção, aferido pelo aparelho. De forma a construir uma recta padrão, o Ct de cada diluição foi avaliado contra o nº de cópias alvo de cada uma das diluições. A comparação entre a amplificação de cada um destes pontos e a amostra permite a quantificação desta pelo software 7300 System SDS (Applied Biosystems). O controlo negativo foi novamente efectuado através do uso de água.

6.4.3. Vírus da Leucemia Felina (FeLV)

Para a quantificação da carga de provirus de FeLV dos gatos FeLV⁺ e FIV/FeLV⁺, o ADN extraído das amostras sanguíneas foi amplificado por PCR em Tempo Real também pela metodologia TaqMan[®] de forma idêntica ao descrito para o FHV-1 (Tandon et al., 2005) (Tabela 4, Tabela 5 e Tabela 6). O controlo positivo usado foi o plasmídeo recombinante pGEM-FeLV-U5-LTR (Laboratório de Virologia da FMV). A quantificação foi efectuada de modo semelhante ao realizado para o FHV-1.

6.4.4. Primers, Sondas e Ciclos de Amplificação de PCR

Tabela 4: Sequência nucleotídica dos *primers* utilizados nos PCRs para amplificação dos diferentes vírus (vírus, identificação do *primer*, sequência nucleotídica e dimensão do fragmento de ADN a amplificar).

Vírus	Nome	Sequência	Fragmento
FCV ¹	CalF	<i>Primer forward:</i> GNA AAG CWC AAC AAA TTG AATT	140 bp
	CalR	<i>Primer reverse:</i> CHTGTACCCTYTGTCTCAAG	
FHV-1 ²	HerpF	<i>Primer forward:</i> ACGTGGTGAATTATCAGCTGAAG	
	HerpR	<i>Primer reverse:</i> AAGGTATGGTGCGGCAAATC	
FeLV ³	FeLV U3-exo f	<i>Primer forward:</i> AAC AGC AGA AGT TTC AAG GCC	
	FeLV U3-exo r	<i>Primer reverse:</i> TTA TAG CAG AAA GCG CGC G	

¹ Wilhelm et al., 2006

² Calculado com base no fragmento incluído do gene da timidina quinase (Sykes et al, 2001) com o auxílio do programa Primer Express®, da Applied Biosystems (Laboratório de Virologia da FMV)

³ Tandon et al., 2005

Tabela 5: Sondas utilizadas nos PCRs para amplificação dos diferentes vírus (vírus, identificação da sonda, sequência nucleotídica e dimensão do fragmento de ADN a amplificar).

Vírus	Sonda	Sequência	Fragmento
FHV-1 ¹	TaqMan	TGC TGC CTA TAT CAC CGC CCA CTA TCA A	28 b
FeLV ²	TaqMan	CCA GCA GTC TCC AGG CTC CCC A	22 b

¹ Calculado com base na sequência nucleotídica do produto incluído do gene da timidina quinase (Sykes et al., 2001) com o auxílio do programa Primer Express®, da Applied Biosystems (Laboratório de Virologia da FMV)

² Tandon et al., 2005

Tabela 6: Ciclos de amplificação utilizados para os diferentes vírus.

Vírus	Transcrição Reversa	Fase inicial da desnaturação	Desnaturação	Hibridação	Extensão	Fase final da extensão
FCV	42°C/30mn	95°C/5mn	95°C/30seg	52°C/30seg 35 Ciclos	68°C/30seg	68°C/10mn
FHV-1		95°C/10mn		95°C/15seg 50 Ciclos		60°C/1 min
FeLV		95°C/10mn		95°C/15seg 50 Ciclos		60°C/1 min

A determinação da carga viral de FHV-1 e da carga proviral de FeLV foi calculada em moléculas/μl com base na fórmula:

$$\frac{X \text{ g/}\mu\text{l RNA}}{\text{Dimensão do Plasmídeo pb} \times 660} \times 6,022 \times 10^{23} = Y \text{ moléculas/}\mu\text{l}$$

6.5. Análise Estatística

Para a análise estatística dos resultados, recorreu-se a dois programas - o Excel 2007 do Microsoft Office[®] (Microsoft Corporation, EUA) e o SPSS[®] Statistics versão 17.0 (International business machines[®] - IBM[®] -, EUA). Foram utilizados métodos de estatística descritiva para a apresentação das variáveis estudadas em gráficos, tabelas e medidas numéricas de síntese. Para avaliar a variação dos sinais clínicos, do hemograma e do proteinograma recorreu-se ainda ao teste estatístico não paramétrico de Wilcoxon, para amostras emparelhadas, após os pressupostos da normalidade de algumas variáveis não terem sido validados pelo teste estatístico de Kolmogorov-Smirnov. Foi ainda utilizado o teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de comparação múltipla das médias das ordens como descrito em Maroco (2007), para procurar diferenças estatisticamente significativas nos parâmetros do proteinograma entre os três grupos de gatos (FIV⁺, FeLV⁺ e FIV/FeLV⁺). Nas diferentes comparações estatísticas, foi utilizado um nível de significância (p) de 0,05.

RESULTADOS

1. Despiste de FIV e FeLV

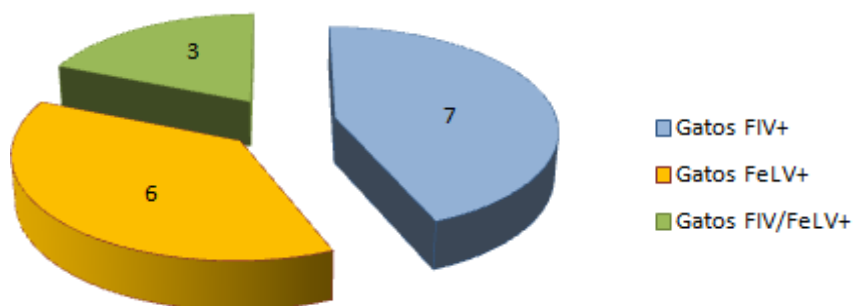
A confirmação da positividade a FIV e a FeLV detectou a presença de 11 animais FIV⁺ distribuídos pelo gatil de FIV (n=8) e de FeLV (n=3) e 13 gatos FeLV⁺, todos pertencentes ao gatil de FeLV. Os gatos 14, 15 e 16 testaram positivo a ambos os vírus (FIV/FeLV⁺) (Tabela 7).

Tabela 7: Resultados dos testes ELISA para confirmação da presença de FIV e/ou FeLV nos gatos dos gatis de FIV e de FeLV da U.Z.L.

U.Z.L.	Nome	Número	Teste FIV	Teste FeLV
Gatil de FIV	Jerry	1	+	-
	Stripes	Adoptado	+	-
	Dylan	2	+	-
	Faustino	3	+	-
	Ezequiel	4	+	-
	Pabla	Excluído	-	-
	Mel	Excluído	-	-
	Mini-Marta	5	+	-
	Marylin	6	+	-
	Preto	7	+	-
Gatil de FeLV	Ervilha	8	-	+
	Tremoço	9	-	+
	Nino	10	-	+
	Noah	Adoptado	-	+
	Chocolate	11	-	+
	Simba	14	+	+
	Jolie	12	-	+
	Pretinho	13	-	+
	Estrelinha	Adoptado	-	+
	Maria	Adoptado	-	+
	Nikky	15	+	+
	Jackeline	16	+	+
	Amarylis	Adoptado	-	+

Após realização do despiste de FIV e de FeLV e retirados os animais que foram adoptados e os que se revelaram negativos, ficaram disponíveis para o presente estudo 7 gatos FIV⁺ (gato 1 até ao 7), 6 gatos FeLV⁺ (gato 8 até 13) e 3 co-infectados FIV/FeLV⁺ (gato 14 até 16) (Gráfico 1).

Gráfico 1: Distribuição dos gatos infectados, em número absoluto, dos três grupos da amostra populacional (FIV⁺, FeLV⁺ e FIV/FeLV⁺).

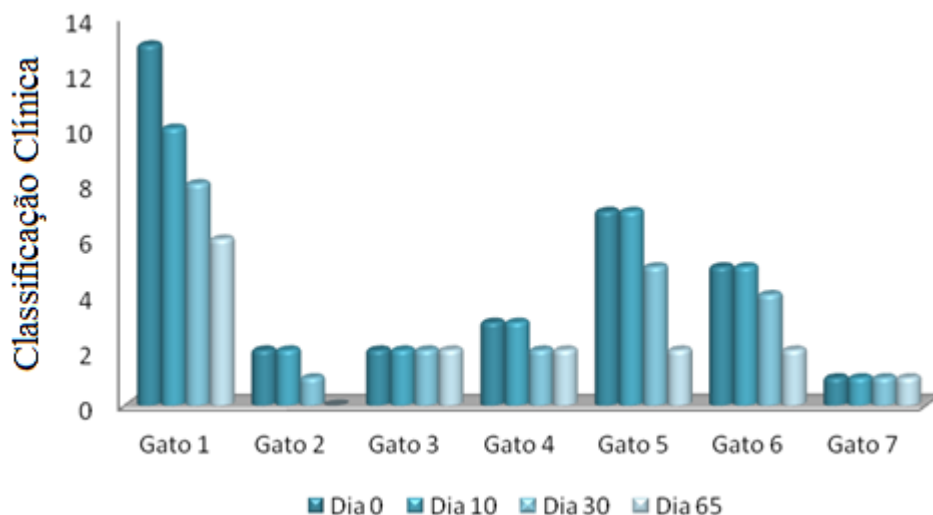


2. Efeito do Tratamento com rFeIFN- ω nos Sinais Clínicos

A classificação clínica (CC) atribuída nos diferentes dias do exame clínico permitiu uma avaliação da evolução do estado clínico dos animais em estudo durante o tratamento.

No grupo dos 7 gatos FIV⁺ 5 (71,4%) animais apresentaram melhorias clínicas, 2 (28,6%) mantiveram o seu quadro clínico e nenhum animal piorou durante a administração de rFeIFN- ω (Gráfico 2).

Gráfico 2: Evolução clínica dos gatos FIV⁺ avaliada pelos 4 exames clínicos realizados ao longo do tratamento.



Nos gatos FIV⁺ as afecções orais foram os parâmetros clínicos que mais variaram, apresentando uma melhoria muito significativa ao longo do tratamento. De um modo geral, a melhoria tende a ser mais evidente nos parâmetros clínicos que obtiveram inicialmente uma CC mais elevada, ou seja, os que se encontravam em pior estado clínico. Neste grupo não existiram evoluções negativas em nenhum parâmetro clínico (Tabela 8).

Tabela 8: Classificação clínica (CC) absoluta e em percentagem, obtida pelo conjunto dos gatos FIV⁺, nos diferentes parâmetros do exame clínico mostrando a evolução a partir da diferença de valores obtidos na classificação do dia 0 e do dia 65.

Sinais Clínicos	Dia 0		Dia 65		Diferença		Evolução
	V. Abs.	%	V. Abs.	%	Abs.	%	
Úlceras Orais/gengivite	12	86%	6	43%	6	43%	+++
Granulomas Orais	6	43%	2	14%	4	29%	++
Conjuntivite (uni/bilateral)	2	14%	0	0%	2	14%	+
Linfadenomegália	1	7%	0	0%	1	7%	+
Corrimento ocular	1	7%	1	7%	0	0%	0
Corrimento nasal	2	14%	1	7%	1	7%	+
Mucosas pálidas	0	0%	0	0%	0	0%	0
Pêlo seco/seborreia	1	7%	1	7%	0	0%	0
Condição corporal	5	36%	2	14%	3	21%	+
Consistência fecal	1	7%	0	0%	1	7%	+
Palpação abdominal	0	0%	0	0%	0	0%	0
Co-morbilidade	2	14%	2	14%	0	0%	0

Legenda: “+” evolução positiva; “0” evolução neutra; V.Abs-Valor absoluto.

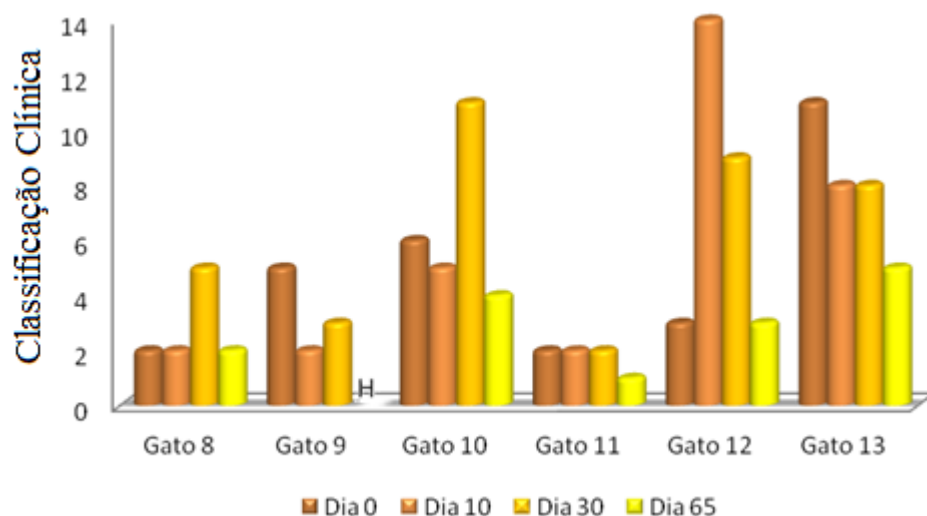
A média da CC dos gatos FIV⁺ diminuiu gradualmente ao longo do tratamento, iniciando com um valor médio de CC de 4,57 ao dia 0, 4,14 ao dia 10, 3,14 ao dia 30 e terminando com 1,86 ao dia 65 (Tabela 9). Neste grupo de gatos a redução da classificação clínica observada foi estatisticamente significativa comparando o dia 0, antes do tratamento, com o dia 65, depois do tratamento (p=0,043).

Tabela 9: Parâmetros estatísticos relativos à classificação clínica dos gatos FIV⁺ durante o tratamento.

	Nº	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	Desvio Padrão
Exame Clínico - Dia 0	7	0	13	3	4,57	4,353
Exame Clínico - Dia 10	7	0	10	3	4,14	3,436
Exame Clínico - Dia 30	7	0	8	2	3,14	2,734
Exame Clínico - Dia 65	7	0	6	2	1,86	2,035

No grupo dos 6 gatos FeLV⁺, quando comparado o dia 0 com o dia 65, 3 (50%) apresentaram melhorias clínicas, 2 (33,3%) mantiveram o seu quadro clínico e 1 (16,6%) piorou clinicamente durante a administração de rFeIFN- ω , tendo sido hospitalizado no fim do estudo (Gráfico 3).

Gráfico 3: Evolução clínica dos gatos FeLV⁺ avaliada pelos 4 exames clínicos realizados ao longo do tratamento.



Legenda: H - Gato hospitalizado ao dia 65.

No grupo de gatos FeLV⁺, à semelhança do que se observou no grupo de gatos FIV⁺, as afecções orais foram os parâmetros clínicos que mais variaram, apresentando uma melhoria muito significativa ao longo do tratamento. As melhorias mais evidentes foram observadas nos animais que inicialmente apresentaram maior CC. Registaram-se evoluções negativas na conjuntivite e condição corporal, mas sem grande significado (Tabela 10).

Tabela 10: Classificação clínica (CC) absoluta e em percentagem, obtida pelo conjunto dos gatos FeLV⁺ no exame clínico, mostrando a evolução a partir da diferença de valores obtidos na classificação do dia 0 e do dia 65.

Sinais Clínicos	Dia 0		Dia 65		Diferença		Evolução
	V. Abs.	%	V. Abs.	%	Abs.	%	
Úlceras Oraís/gengivite	9	75%	5	42%	4	33%	++
Granulomas Oraís	2	17%	1	8%	1	8%	+
Conjuntivite (uni/bilateral)	1	8%	2	17%	-1	-8%	-
Linfadenomegália	2	17%	0	0%	2	17%	+
Corrimento ocular	4	33%	0	0%	4	33%	++
Corrimento nasal	1	8%	0	0%	1	8%	+
Mucosas pálidas	1	8%	0	0%	1	8%	+
Pêlo seco/seborreia	3	25%	0	0%	3	25%	+
Condição corporal	1	8%	3	25%	-2	-17%	-
Consistência fecal	3	25%	1	8%	2	17%	+
Palpação abdominal	1	8%	0	0%	1	8%	+
Co-morbilidade	5	42%	3	25%	2	17%	+

Legenda: “+” evolução positiva; “-” evolução negativa; V.Abs.-Valor absoluto.

A média da CC dos gatos FeLV⁺ foi inicialmente (dia 0) de 4,5 valores, subindo para 5,5 ao dia 10 e para 6,33 ao dia 30, no entanto, no final do tratamento (dia 65) obteve a classificação de 2,5 (Tabela 11). Apesar da elevação da CC nos dias 10 e 30, quando comparada só a do dia

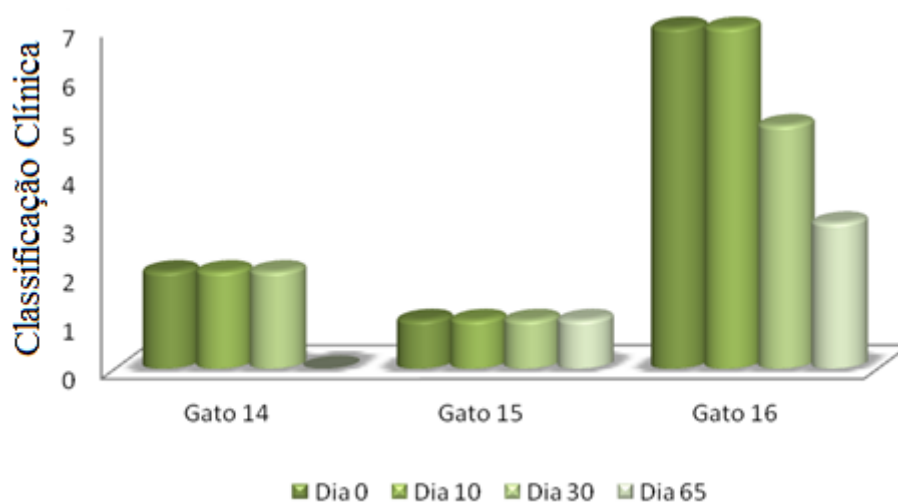
0 com a do dia 65, observou-se uma diminuição do valor médio, embora sem relevância estatística.

Tabela 11: Parâmetros estatísticos relativos à classificação clínica dos gatos FeLV⁺ durante o tratamento.

	Nº	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	Desvio Padrão
Exame Clínico - Dia 0	6	2	13	3	4,50	3,507
Exame Clínico - Dia 10	6	2	10	3,5	5,50	4,806
Exame Clínico - Dia 30	6	2	8	6,5	6,33	3,559
Exame Clínico - Dia 65	6	0	6	2,5	2,50	1,871

Nos 3 gatos co-infectados verificou-se que 2 (66,7%) melhoraram a sintomatologia clínica com o tratamento, enquanto o gato 15 manteve o mesmo quadro clínico de bom estado físico. Mais uma vez, nenhum animal piorou clinicamente durante a administração de rFeIFN- ω (Gráfico 4).

Gráfico 4: Evolução clínica dos gatos FIV/FeLV⁺ avaliada pelos 4 exames clínicos realizados ao longo do tratamento.



No grupo de gatos co-infectados, à semelhança do que se observou nos outros dois grupos, as afecções orais foram os parâmetros clínicos que mais variaram, apresentando uma melhoria muito significativa ao longo do tratamento. Os animais que mais melhoraram foram os que inicialmente possuíam maior CC. Neste grupo não existiram evoluções negativas em nenhum parâmetro clínico (Tabela 12).

Tabela 12: Classificação clínica (CC) absoluta e em percentagem, obtida pelo conjunto dos gatos FIV/FeLV⁺, no exame clínico mostrando a evolução a partir da diferença de valores obtidos na classificação do dia 0 e do dia 65.

Sinais Clínicos	Dia 0		Dia 65		Diferença		Evolução
	V. Abs.	%	V. Abs.	%	Abs.	%	
Úlceras Orais/gengivite	4	67%	1	17%	3	50%	++
Granulomas Orais	2	33%	1	17%	1	17%	+
Conjuntivite (uni/bilateral)	0	0%	0	0%	0	0%	0
Linfadenomegália	0	0%	0	0%	0	0%	0
Corrimento ocular	0	0%	0	0%	0	0%	0
Corrimento nasal	0	0%	0	0%	0	0%	0
Mucosas pálidas	0	0%	0	0%	0	0%	0
Pêlo seco/seborreia	1	17%	0	0%	1	17%	+
Condição corporal	1	17%	1	17%	0	0%	0
Consistência fecal	1	17%	0	0%	1	17%	+
Palpação abdominal	0	0%	0	0%	0	0%	0
Co-morbilidade	1	17%	1	17%	0	0%	0

Legenda: “+” evolução positiva; “0” evolução neutra; V.Abs- Valor absoluto.

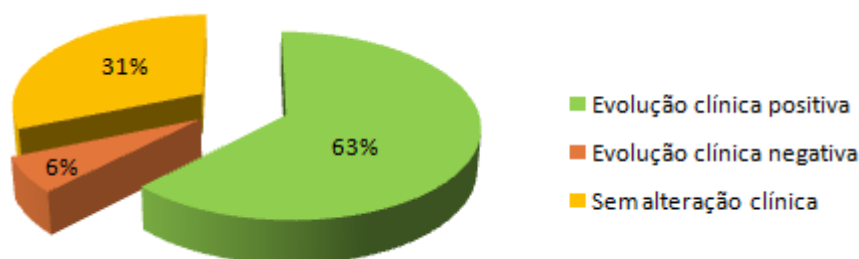
A média dos valores de CC dos 3 gatos co-infectados sofreu uma oscilação subindo de 1,00 ao dia 0 para 3,33 ao dia 10 e 2,67 ao dia 30, terminando com um valor de 1,33 ao dia 65 (Tabela 13). O aumento da média da classificação clínica dos gatos co-infectados (FIV/FeLV⁺) ao longo do tratamento não foi estatisticamente significativo.

Tabela 13: Parâmetros estatísticos relativos à classificação clínica dos gatos FIV/FeLV⁺ durante o tratamento.

	Nº	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	Desvio Padrão
Exame Clínico - Dia 0	3	0	2	1	1,00	1,000
Exame Clínico - Dia 10	3	1	7	2	3,33	3,215
Exame Clínico - Dia 30	3	1	5	2	2,67	2,082
Exame Clínico - Dia 65	3	0	3	1	1,33	1,528

Analisando a evolução clínica no conjunto de gatos (FIV⁺, FeLV⁺ e FIV/FeLV⁺), e comparando a CC do dia 0 com a CC do dia 65, constata-se que no final do ensaio, 62,5% melhoraram a sua condição clínica (evolução clínica positiva), 31,3% mantiveram-na (sem alteração clínica) e 6,3% pioraram clinicamente (evolução clínica negativa) (Gráfico 5).

Gráfico 5: Distribuição dos gatos, em percentagem, no final do tratamento conforme a sua evolução clínica.

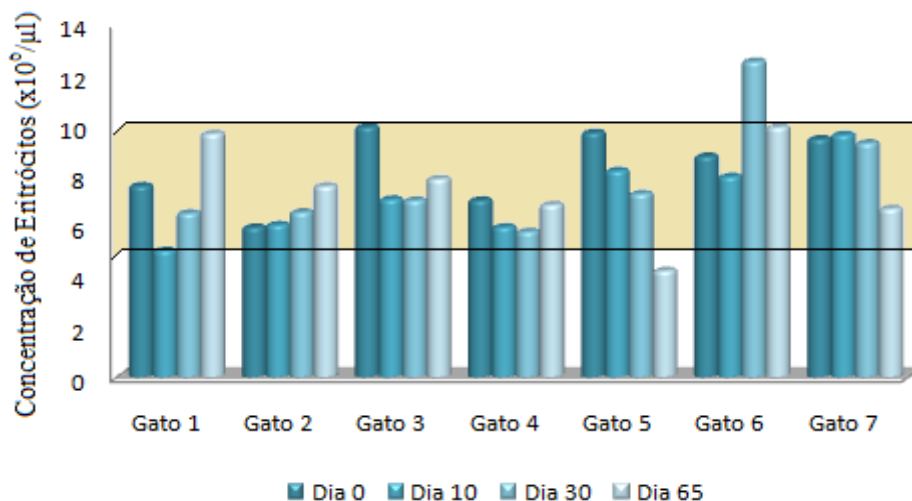


3. Efeito do Tratamento com rFeIFN- ω nos Parâmetros Hematológicos

3.1. Hemograma

Todos os gatos FIV⁺ apresentaram concentrações de eritrócitos dentro do intervalo de valores de referência, tanto no início como no fim do tratamento, à excepção do gato 5 que apresentou uma anemia ao dia 65 (Gráfico 6). Os valores do hematócrito (Ht) também não variaram de modo relevante ao longo do tratamento, pois todos os gatos mostraram um valor dentro do intervalo de referência, quer no início quer no fim, à excepção novamente do gato 5, que terminou com um valor ligeiramente abaixo do mínimo de referência.

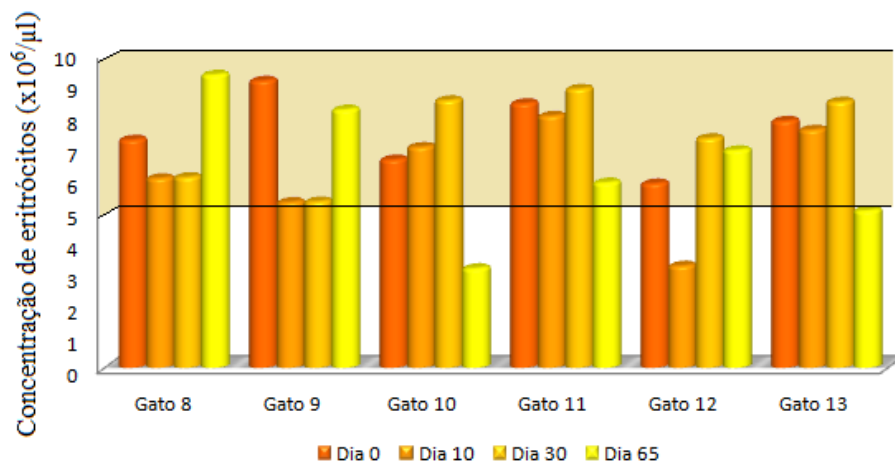
Gráfico 6: Variação da concentração de eritrócitos nos gatos FIV⁺ durante o tratamento.



Legenda: Zona sombreada corresponde ao intervalo entre os valores de referência da concentração de eritrócitos em gatos ($5-10 \times 10^6$ eritrócitos/ μ l).

Durante o tratamento, todos gatos FeLV⁺ apresentaram concentrações de eritrócitos dentro do intervalo de valores de referência, com excepção dos gatos 10 e 12 que apresentaram anemia ao dia 65 e ao dia 10, respectivamente (Gráfico 7). Nestes animais o valor do hematócrito também se apresentou abaixo do valor mínimo de referência e no gato 12 foi detectada infecção com o hemoparasita *Mycoplasma haemofelis*.

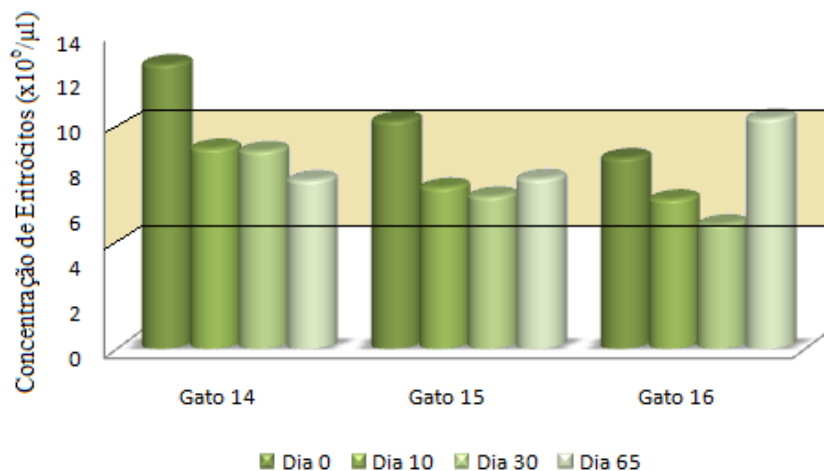
Gráfico 7: Variação da concentração de eritrócitos nos gatos FeLV⁺ durante o tratamento.



Legenda: Zona sombreada corresponde ao intervalo entre os valores de referência da concentração de eritrócitos em gatos ($5-10 \times 10^6$ eritrócitos/ μl).

Durante o tratamento todos gatos co-infectados (FIV/FeLV⁺) apresentaram concentrações de eritrócitos dentro do intervalo de valores de referência (Gráfico 8). O gato 14, que ao dia 0 apresentava uma policitemia ligeira e um Ht superior ao valor máximo de referência, ao dia 10 já se encontrava com valores normais. O gato 16 apresentou ao dia 30 um valor de Ht de 22% (valor abaixo do mínimo de referência), mas ao dia 65 já possuía valores normais.

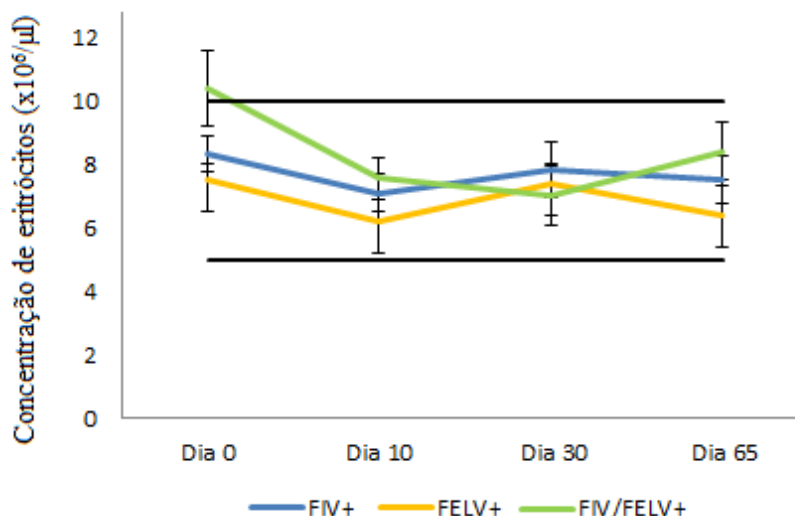
Gráfico 8: Variação da concentração de eritrócitos nos gatos FIV/FeLV⁺ durante o tratamento.



Legenda: Zona sombreada corresponde ao intervalo entre os valores de referência da concentração de eritrócitos em gatos ($5-10 \times 10^6$ eritrócitos/ μl).

Nos 3 grupos de gatos a média dos valores da concentração de eritrócitos esteve sempre dentro do intervalo dos valores de referência durante o tratamento com exceção do grupo de gatos co-infectados que no dia 0 apresentavam um valor médio ligeiramente acima do valor máximo de referência (Gráfico 9).

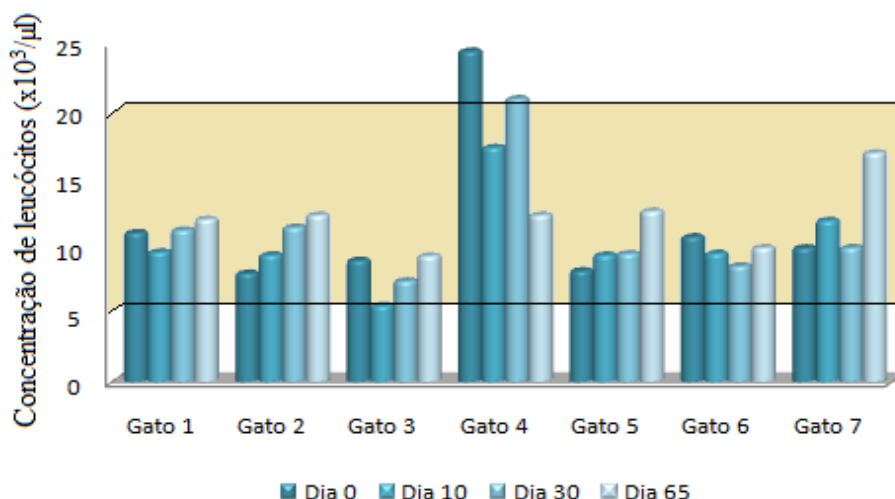
Gráfico 9: Variação da concentração média de eritrócitos, e respectivo erro padrão, nos grupos de gatos FIV⁺, FeLV⁺ e FIV/FeLV⁺ durante o tratamento.



Legenda: Linhas a preto representam o valor mínimo e máximo de referência da concentração de eritrócitos em gatos ($5-10 \times 10^6$ eritrócitos/ μl).

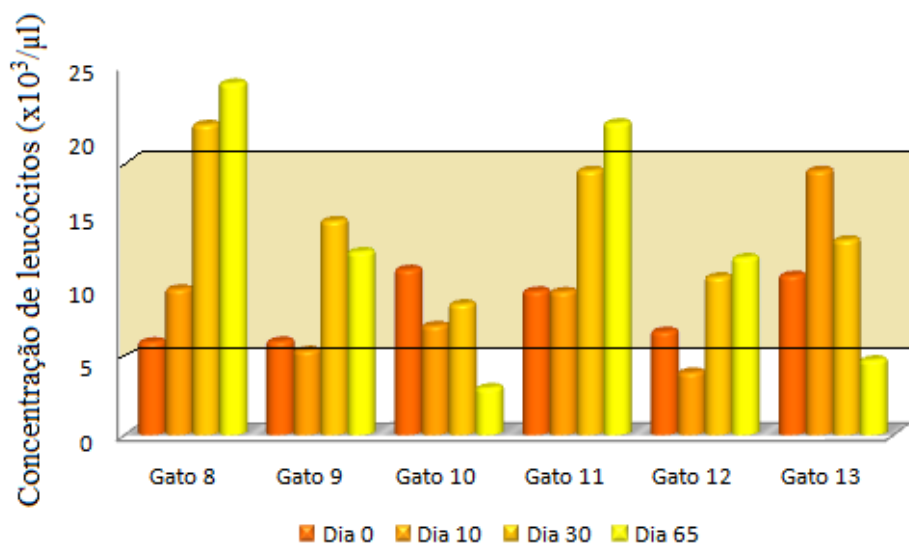
No que respeita aos leucogramas observou-se que apenas um gato apresentou leucocitose ligeira ao dia 0 (gato 4) e dois animais terminaram o tratamento apresentando leucocitose ligeira (gatos 8 e 11) e outros dois gatos leucopénia (gatos 10 e 13) (Gráfico 10 e gráfico 11). Os restantes gatos apresentaram ao longo do ensaio concentrações de leucócitos dentro do intervalo de valores de referência (Gráfico 12).

Gráfico 10: Variação da concentração de leucócitos nos gatos FIV⁺ durante o tratamento.



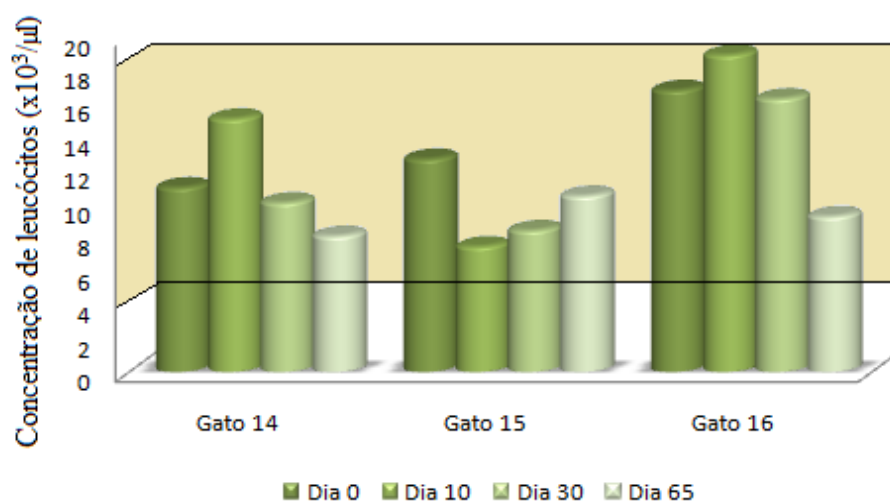
Legenda: Zona a sombreado corresponde ao intervalo entre os valores de referência da concentração de leucócitos em gatos ($5,5-19,5 \times 10^3$ / μl).

Gráfico 11: Variação da concentração de leucócitos nos gatos FeLV⁺ durante o tratamento.



Legenda: Zona sombreada corresponde ao intervalo entre os valores de referência da concentração de leucócitos em gatos ($5,5-19,5 \times 10^3/\mu\text{l}$).

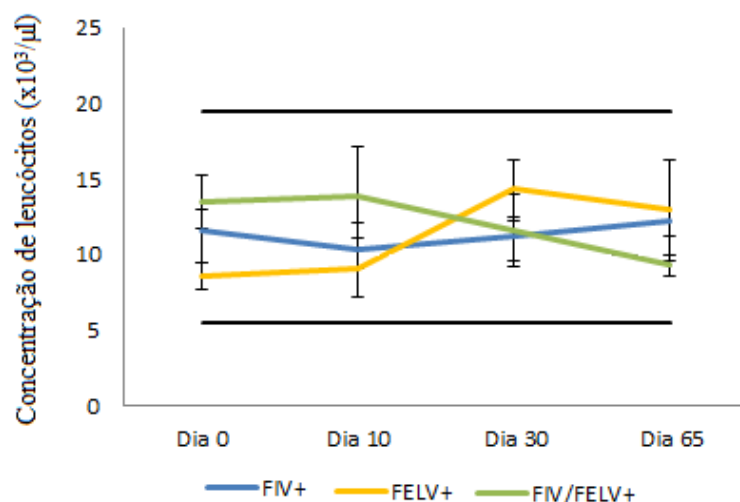
Gráfico 12: Variação da concentração de leucócitos nos gatos com FIV/FeLV⁺ durante o tratamento.



Legenda: Zona sombreada corresponde ao intervalo entre os valores de referência da concentração de leucócitos em gatos ($5,5-19,5 \times 10^3/\mu\text{l}$).

Em qualquer dos grupos considerados as concentrações médias de leucócitos estiveram sempre dentro do intervalo de valores referência durante o tratamento (Gráfico 13).

Gráfico 13: Variação da concentração média de leucócitos, e respectivo erro padrão, dos grupos de gatos FIV⁺, FeLV⁺ e FIV/FeLV⁺ durante o tratamento.



Legenda: Linhas a preto representam o valor mínimo e máximo de referência da concentração de leucócitos em gatos (5,5-19,5x10³/μl).

Tabela 14: Variação da média dos diferentes parâmetros do hemograma dos gatos FIV⁺, comparando os valores do dia 0 e do dia 65.

	Eritrócitos	Hematócrito	Leucócitos	Linfócitos	Neutrófilos	Monócitos
Variação	↓	↓	↑	↓	↓	↓

Legenda: “↑” aumento; “↓” diminuição.

Quando comparada a amostra no dia 0, antes do tratamento, com a amostra no dia 65, depois do tratamento, verifica-se que no grupo dos gatos FIV⁺ a concentração de eritrócitos, linfócitos, neutrófilos e monócitos e o Ht diminuiu, enquanto a concentração de leucócitos aumentou (Tabela 14). No entanto, as médias das concentrações destes parâmetros estiveram sempre dentro do intervalo de valores de referência e nenhuma das variações observadas foi estatisticamente significativa.

Tabela 15: Variação da média dos diferentes parâmetros do hemograma dos gatos FeLV⁺, comparando os valores do dia 0 e do dia 65.

	Eritrócitos	Hematócrito	Leucócitos	Linfócitos	Neutrófilos	Monócitos
Variação	↓	↓	↑	↓	↑	↓

Legenda: “↑” aumento; “↓” diminuição.

No grupo de gatos FeLV⁺ a concentração de eritrócitos, linfócitos e monócitos e o Ht diminuiu, enquanto a concentração de leucócitos e neutrófilos aumentou durante o tratamento, quando comparada a amostra no dia 0 com a amostra do dia 65 (Tabela 15). Também neste

grupo de gatos as médias das concentrações de todos os parâmetros estiveram dentro do intervalo de valores de referência, tanto ao dia 0 como ao dia 65, e nenhum dos parâmetros variou de maneira estatisticamente significativa com o tratamento.

Tabela 16: Variação da média dos diferentes parâmetros do hemograma dos gatos FIV/FeLV⁺, comparando os valores do dia 0 e do dia 65.

	Eritrócitos	Hematócrito	Leucócitos	Linfócitos	Neutrófilos	Monócitos
Variação	↓	↓	↓	↓	↓	↓

Legenda: “↑” aumento; “↓” diminuição.

No grupo de gatos co-infectados todos os parâmetros dos hemogramas avaliados através da média sofreram uma diminuição quando comparada a amostra do dia 0 com a amostra do dia 65 (Tabela 16). Os valores destes parâmetros mantiveram-se dentro do intervalo de valores de referência, tanto ao dia 0 como ao dia 65, e nenhuma das variações observadas se mostrou estatisticamente significativa.

3.2. Parâmetros Bioquímicos

Todos os animais (16/16) apresentaram os valores dos parâmetros bioquímicos renais (ureia e creatinina) dentro do intervalo de valores de referência durante o tratamento. Quinze gatos (15/16) apresentaram os valores dos parâmetros hepáticos (AST e ALT) dentro do intervalo de valores de referência durante o tratamento, enquanto o gato 16 terminou o tratamento com uma concentração de AST de 146U/l, acima do valor máximo de referência.

3.3. Proteinograma

No grupo de gatos FIV⁺ a concentração de albumina esteve dentro do intervalo de valores de referência durante o ensaio à exceção de 2 gatos que terminaram o tratamento com hiperalbuminemia (Tabela 17); todos os gatos deste grupo apresentaram ao dia 0 a concentração da globulina- α 1 abaixo do valor mínimo de referência e ao dia 65 havia 4 animais com concentrações com valores normais; a concentração da globulina- α 2 apresentou-se sempre acima do valor máximo de referência em todos os animais ao longo do tratamento à exceção do gato 7 que termina o estudo com um valor normal; no início do estudo 5 gatos apresentaram concentrações de globulina- β abaixo do valor mínimo de referência e ao dia 65 apenas 4; ao dia 0 existiam 5 gatos com hipergamaglobulinemia e ao dia 65 todos os animais possuíam hipergamaglobulinemia com exceção do gato 5 que manteve a concentração dentro do intervalo de valores de referência; ao início do tratamento 5 gatos possuíam

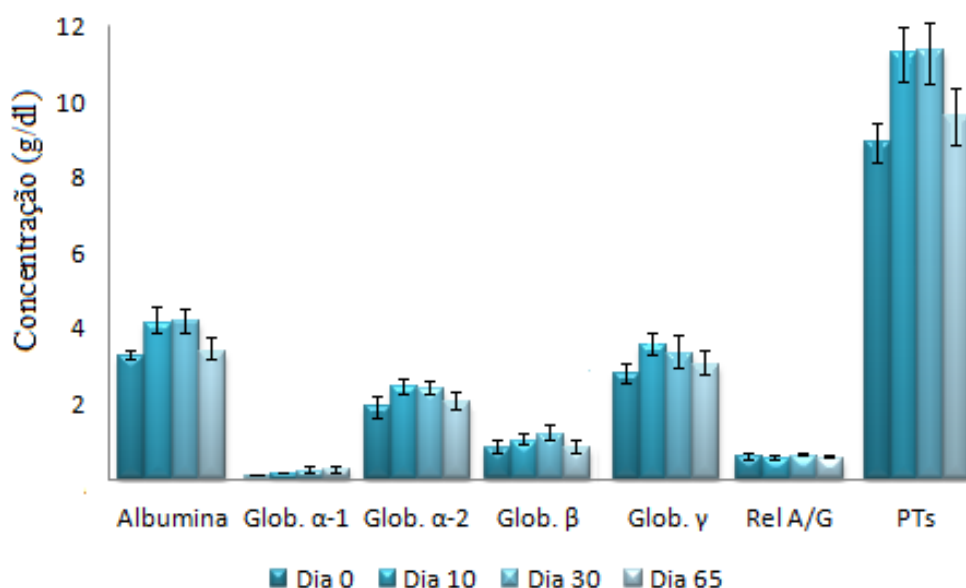
hiperproteinemia e 4 deles agravaram-na ao longo do tratamento; apenas 1 gato possuía valores de rel A/G abaixo do valor de referência ao dia 0 e outro ao dia 65 (Tabela 17).

Tabela 17: Valores do proteinograma ao dia 0 e 65 nos gatos FIV⁺.

		Gato 1	Gato 2	Gato 3	Gato 4	Gato 5	Gato 6	Gato 7
Albumina	Dia 0	3,3	3,6	3,3	3	3,6	3	3,2
[2,1 – 4]	Dia 65	3,2	4,6	4,3	2,8	2,9	2,5	3,4
Globulina- α 1	Dia 0	0	0	0,1	0,1	0	0,1	0
[0,2 – 1,1]	Dia 65	0,9	0,3	0,3	0,2	0,1	0	0,1
Globulina- α 2	Dia 0	1,6	1,5	1,7	2,1	1,6	3,5	1,7
[0,4 – 0,9]	Dia 65	2,4	2,3	2,5	2,2	1,8	2,4	0,8
Globulina- β	Dia 65	1,1	0,8	0,6	0,5	0,4	1,7	0,6
[0,9 – 1,9]	Dia 65	0,6	1,3	1,3	0,5	0,4	0,4	1,4
Globulina- γ	Dia 0	3	2	2,8	3,9	2	3,3	2,7
[1,3 – 2,2]	Dia 65	3,3	3,5	3,2	4,3	2	2,3	2,7
PTs	Dia 0	9	7,9	8,5	9,6	7,6	11,6	8,2
[5,7 – 7,9]	Dia 65	10,4	12	11,6	10	7,2	7,6	8,4
Rel A/G	Dia 0	0,57	0,85	0,66	0,44	0,86	0,35	0,62
[0,45 – 1,3]	Dia 65	0,45	0,62	0,62	0,39	0,66	0,47	0,69

Legenda: Na coluna à esquerda encontra-se a proteína pesquisada e os valores do seu intervalo de referência; a vermelho representam-se os valores que estão fora do intervalo de referência.

Gráfico 14: Variação da concentração média e erro padrão dos diferentes parâmetros do proteinograma nos gatos FIV⁺ durante o tratamento.



No grupo de gatos FIV⁺, a concentração de albumina, globulina- α 1, globulina- α 2, globulina- β , globulina- γ e PTs aumentou, enquanto a relação A/G diminuiu, quando comparada a amostra no dia 0 e no dia 65 (Tabela 18 e Gráfico 14). A média da concentração de albumina e

globulina- α 1 e a relação A/G apresentaram-se dentro dos intervalos de valores de referência, tanto ao dia 0 como ao dia 65, já a globulina- α 2, globulina- γ e PTs apresentaram concentrações médias acima do valor máximo de referência, tanto ao dia 0 como ao dia 65. A concentração média da globulina- β encontrou-se abaixo do valor mínimo de referência tanto ao dia 0 como ao dia 65. Neste grupo de gatos apenas a concentração da globulina- α 1, em termos médios, sofreu uma variação estatisticamente significativa após o tratamento com rFeIFN- ω ($p=0,048$).

Tabela 18: Variação da média dos diferentes parâmetros do proteinograma dos gatos FIV⁺, comparando os valores do dia 0 e do dia 65

	Alb.	G- α 1	G- α 2	G- β	G- γ	Rel A/G	PTs
Variação	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↑

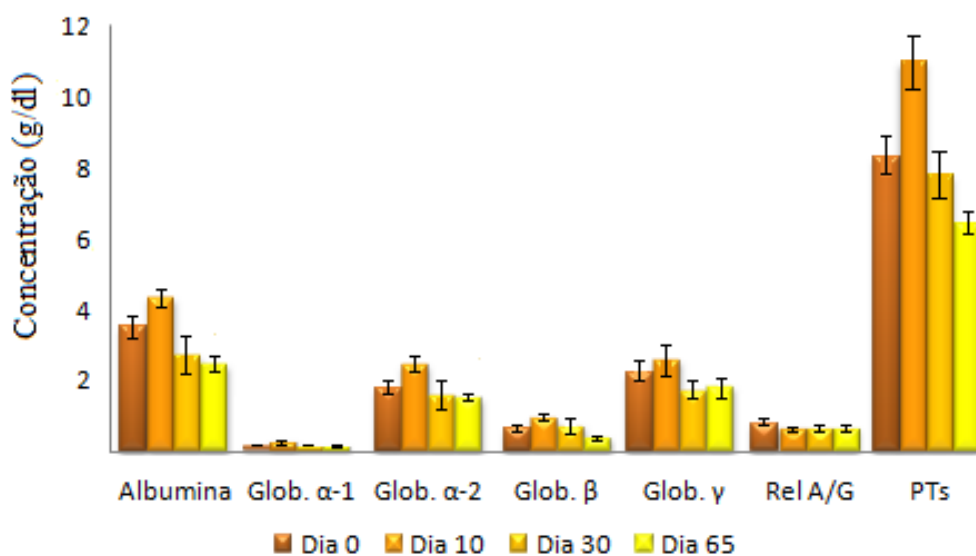
Legenda: “↑” aumento; “↓” diminuição.

No grupo de gatos FeLV⁺ a concentração de albumina esteve dentro do intervalo de valores de referência durante o ensaio à exceção de 1 gato que terminou o tratamento com hipoalbuminemia (Tabela 19); a concentração da globulina- α 1 não mostrou grandes alterações mantendo-se sempre abaixo do valor mínimo de referência, apenas 1 gato aumentou ligeiramente a concentração para um valor dentro dos valores de referência; todos os gatos apresentaram a concentração da globulina- α 2 acima do valor de referência tanto ao dia 0 como ao dia 65; a globulina- β no início apresentava um valor abaixo do valor de referência em 5 gatos e, ao longo do tratamento, diminuiu ainda mais, estando todos os gatos com valores abaixo do de referência ao dia 65 (Tabela 19); a globulina- γ sofreu uma diminuição ao longo do tratamento. Ao dia 0 apenas 1 gato apresentava hipergamaglobulinemia e ao dia 65 havia 1 com hipergamaglobulinemia e 1 outro com hipogamaglobulinemia; 4 gatos apresentaram hiperproteinemia no início do tratamento e ao dia 65 apenas 2; todos os gatos apresentaram valores de relação A/G dentro do intervalo de referência ao longo do tratamento, apenas 1 possuía um valor ligeiramente abaixo do mínimo de referência ao dia 65 (Tabela 19).

Tabela 19: Valores do proteinograma ao dia 0 e 65 nos gatos FeLV⁺.

		Gato 8	Gato 9	Gato 10	Gato 11	Gato 12	Gato 13
Albumina [2,1 – 4]	Dia 0	3,5	4,5	3,3	2,3	4	3,7
	Dia 65	1,6	2,7	2,2	2,8	2,8	2,7
Globulina α -1 [0,2 – 1,1]	Dia 0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1
	Dia 65	0,1	0,1	0	0,1	0,1	0,4
Globulina α -2 [0,4 – 0,9]	Dia 0	2,2	2,1	1,4	1,4	1,5	2,2
	Dia 65	1,7	1,4	1,7	1,5	1,3	1,6
Globulina β [0,9 – 1,9]	Dia 65	0,4	0,7	0,5	0,9	0,8	0,7
	Dia 65	0,3	0,6	0,3	0,4	0,4	0,5
Globulina γ [1,3 – 2,2]	Dia 0	3	1,4	2,2	1,7	1,7	1,9
	Dia 65	1,9	0,8	2,6	1,6	1,6	1,8
PTs [5,7 – 7,9]	Dia 0	9,2	8,8	7,5	6,4	8,4	9,6
	Dia 65	5,6	5,6	6,8	6,4	6,4	7,6
Rel A/G [0,45 – 1,3]	Dia 0	0,65	1,07	0,81	0,59	0,88	0,62
	Dia 65	0,4	0,97	0,46	0,77	0,84	0,56

Legenda: Na coluna à esquerda encontra-se a proteína pesquisada e os valores do seu intervalo de referência; a vermelho representam-se os valores que estão fora do intervalo de referência.

Gráfico 15: Variação da concentração média e erro padrão dos diferentes parâmetros do proteinograma nos gatos FeLV⁺ durante o tratamento.

Nos gatos FeLV⁺ a concentração de globulina- α 2 aumentou, enquanto a de albumina, globulina- α 1, globulina- β , globulina- γ e PTs assim como a relação A/G, diminuiu, quando comparada a amostra no dia 0 com a amostra do dia 65 (Tabela 20). Nestes gatos a concentração média de albumina e globulina- γ e a relação A/G encontraram-se dentro do intervalo de valores de referência, tanto ao dia 0 como ao dia 65. A concentração média da globulina- α 2 apresentou-se acima do valor máximo de referência, tanto ao dia 0 como ao dia 65. A concentração média da globulina- α 1 e globulina- β apresentou-se abaixo do valor mínimo de referência, tanto ao dia 0 como ao dia 65. A concentração média das PTs, que se encontrava acima do valor máximo de referência ao dia 0 apresentou ao dia 65 uma

concentração média dentro do intervalo de valores de referência. As únicas variações estatisticamente significativas foram as observadas na albuminemia ($p=0,046$), globulina- β ($p=0,027$) e nas PTs ($p=0,042$).

Tabela 20: Variação dos diferentes parâmetros do proteinograma dos gatos FeLV⁺, comparando os valores do dia 0 e do dia 65.

	Alb.	G- α 1	G- α 2	G- β	G- γ	Rel A/G	PTs
Variação	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↓

Legenda: “↑” aumento; “↓” diminuição.

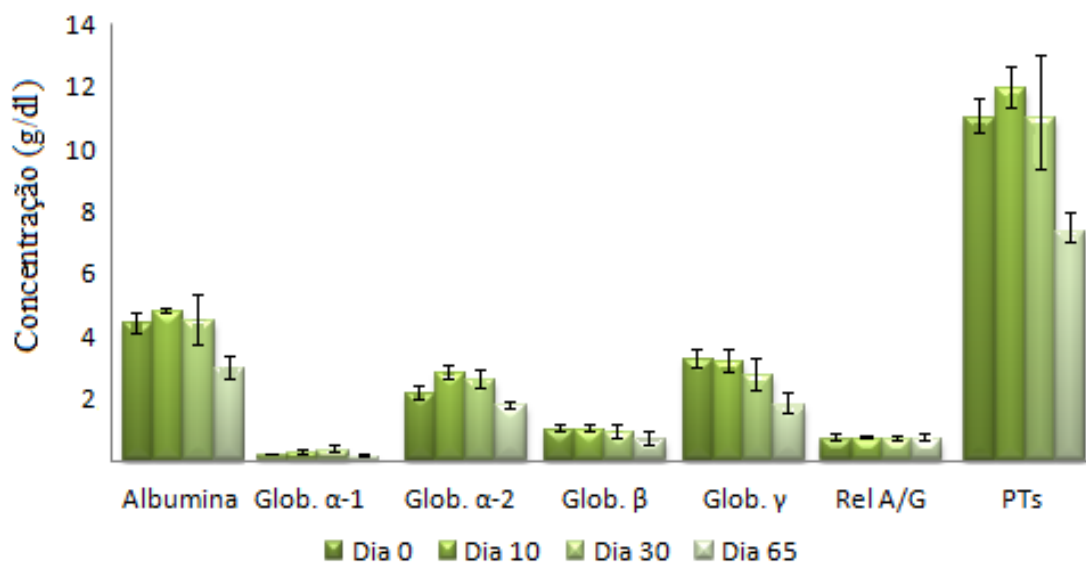
Nos gatos co-infectados (FIV/FeLV⁺), 2 possuíam hiperalbuminemia ao dia 0 e no dia 65 todos os animais tinham a concentração de albumina dentro do intervalo de valores normais; a concentração da globulina- α 1 apresentou-se abaixo do valor de referência ao dia 0 apenas num animal e no dia 65 em 2 (Tabela 21); a concentração da globulina- α 2 esteve sempre acima do valor máximo de referência em todos os gatos co-infectados; ao dia 0 havia 1 animal com a concentração da globulina- β abaixo do valor de referência e no final 2; a concentração da globulina- γ estava acima dos valores normais de referência nos 3 gatos no início do tratamento e todos diminuíram a concentração desta globulina e no final 2 animais apresentaram valores normais e 1 hipogamaglobulinemia; todos os gatos apresentaram hiperproteinemia no início do tratamento e ao dia 65 apenas 1 gato possuía a concentração de proteínas totais acima dos valores de referência; a relação A/G não sofreu quase variação, mantendo-se desde o início até ao fim dentro do intervalo de valores de referência (Tabela 21 e Gráfico 16).

Tabela 21: Valores do proteinograma ao dia 0 e 65 nos gatos FIV/FeLV⁺.

		Gato 14	Gato 15	Gato 16
Albumina [2,1 – 4]	Dia 0	4,8	4,8	3,6
	Dia 65	2,5	2,7	3,6
Globulina- α 1 [0,2 – 1,1]	Dia 0	0,2	0,1	0,2
	Dia 65	0	0,1	0,2
Globulina- α 2 [0,4- 0,9]	Dia 0	2,5	2,5	1,5
	Dia 65	1,6	1,6	2
Globulina- β [0,9 – 1,9]	Dia 65	0,8	1,3	0,9
	Dia 65	0,3	0,8	1
Globulina- γ [1,3- 2,2]	Dia 0	4,2	3,3	2,2
	Dia 65	2	2,2	1,2
PTs [5,7 -7,9]	Dia 0	12,5	12	8,4
	Dia 65	6,4	7,6	8
Rel A/G [0,45 -1,3]	Dia 0	0,62	0,64	0,78
	Dia 65	0,6	0,57	0,83

Legenda: Na coluna à esquerda encontra-se a proteína pesquisada e os valores do seu intervalo de referência; a vermelho representam-se os valores que estão fora do intervalo de referência.

Gráfico 16: Variação da concentração média e erro padrão dos diferentes parâmetros do proteinograma nos gatos FIV/FeLV⁺ durante o tratamento.



Nos gatos co-infectados todos os parâmetros do proteinograma diminuíram a sua concentração média quando comparamos o proteinograma do dia 0 com o proteinograma do dia 65 (Tabela 22 e Gráfico 16). A média da relação A/G manteve-se dentro do intervalo de referência tanto ao dia 0 como ao dia 65. A concentração média da globulina-α2 apresentou-se acima do valor máximo de referência tanto ao dia 0 como ao dia 65. A concentração média da albumina, globulina-α1, globulina-γ e PTs, que se apresentaram acima do valor máximo de referência ao dia 0, mostraram os seus valores dentro deste ao dia 65. Já a média da globulina-β, que apresentou um valor normal ao dia 0 mostrou ao dia 65 um valor abaixo do valor mínimo de referência. No entanto, analisando os resultados do proteinograma dos gatos com FIV/FeLV⁺ não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas em nenhuns dos parâmetros relativos aos proteinogramas quando comparado o dia 0 (antes do tratamento) com o dia 65 (depois do tratamento).

Tabela 22: Variação da média dos diferentes parâmetros do proteinograma dos gatos com FIV/FeLV⁺, comparando os valores do dia 0 e do dia 6.

	Alb.	G-α1	G-α2	G-β	G-γ	Rel A/G	PTs
Variação	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓

Legenda: “↑” aumento; “↓” diminuição.

O grupo de gatos FIV⁺ apresentou ao dia 0 uma diferença estatisticamente significativa na concentração da globulina- α 1 em comparação com o grupo de gatos FeLV⁺ e com o grupo de gatos co-infectados ($p < 0,05$) não havendo diferenças estatisticamente significativas entre os dois últimos grupos. No grupo de gatos FIV⁺ a concentração foi menor que nos outros dois grupos. No dia 0 os valores dos restantes parâmetros do proteinograma não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de gatos estudados.

4. Efeito do Tratamento com rFeIFN- ω na Carga de Provírus de FeLV

As amostras sanguíneas colhidas no dia 0, 10, 30 e 65 permitiram uma avaliação da variação da carga de provírus de FeLV durante o tratamento (Tabela 23).

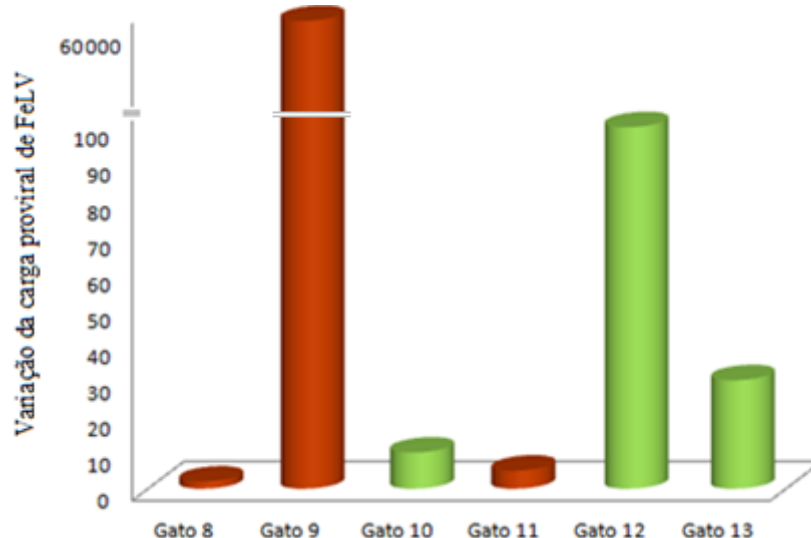
Tabela 23: Carga de provírus de FeLV nos gatos FeLV⁺ e FIV/FeLV⁺ avaliada durante o tratamento e a respectiva variação.

	Dia 0	Dia 10	Dia 30	Dia 65	Variação
Gato 8	2×10^4	2×10^4	3×10^4	5×10^4	↑
Gato 9	3×10^4	5×10^4	8×10^8	2×10^9	↑
Gato 10	$0,6 \times 10$	$0,3 \times 10$	6×10^1	$0,1 \times 10$	↓
Gato 11	4×10^1	2×10^2	1×10^2	2×10^2	↑
Gato 12	2×10^5	3×10^5	1×10^5	3×10^3	↓
Gato 13	4×10^6	7×10^6	6×10^6	2×10^6	↓
Gato 14	9×10^4	1×10^5	1×10^5	2×10^5	↑
Gato 15	2×10^1	1×10^1	2×10^1	2×10^1	↓
Gato 16	5×10^4	6×10^4	3×10^4	2×10^4	↓

Legenda: unidade da carga proviral- moléculas/ μ l; “↑”aumento; “↓”diminuição.

No grupo de gatos FeLV⁺ os gatos 8, 10 e 11 sofreram uma variação da carga proviral de FeLV muito ligeira durante o tratamento (Gráfico 17). Já os gatos 12 e 13 apresentaram uma diminuição mais acentuada, chegando o gato 12 a diminuir a sua carga proviral cerca de 10^2 vezes e o gato 13 cerca de 30 vezes durante ao tratamento (Gráfico 17). O gato 9 foi o animal que mais variou a sua carga proviral exibindo no final do tratamento uma carga proviral de FeLV cerca de 6×10^4 vezes mais elevada que no dia 0 (Gráfico 17).

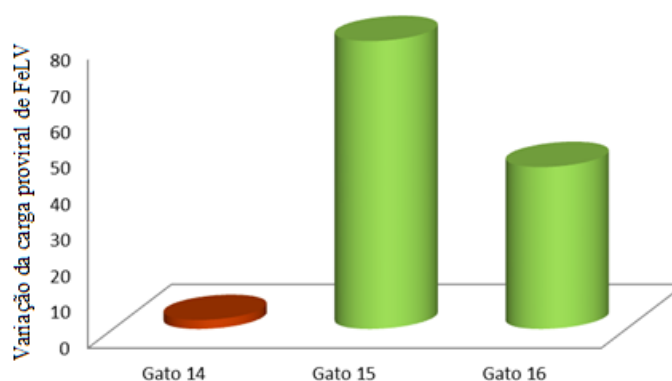
Gráfico 17: Variação da carga de provírus de FeLV nos gatos FeLV⁺ comparando a carga proviral entre o dia 0 e o dia 65.



Legenda: colunas a vermelho representam aumento da carga proviral de FeLV; colunas a verde representam diminuição da carga proviral de FeLV.

No grupo de gatos FIV/FeLV⁺ o gato 14 variou muito ligeiramente a sua carga proviral de FeLV (Gráfico 18). O gato 15 apresentou uma diminuição de cerca de 80 vezes, ao comparar a carga proviral no dia 0 e no dia 65, e o gato 16 também diminuiu a sua carga cerca de 45 vezes ao longo do tratamento (Gráfico 18).

Gráfico 18: Variação da carga de provírus de FeLV nos gatos FIV/FeLV⁺ comparando a carga proviral entre o dia 0 e o dia 65.



Legenda: colunas a vermelho representam aumento da carga proviral de FeLV; colunas a verde representam diminuição da carga proviral de FeLV.

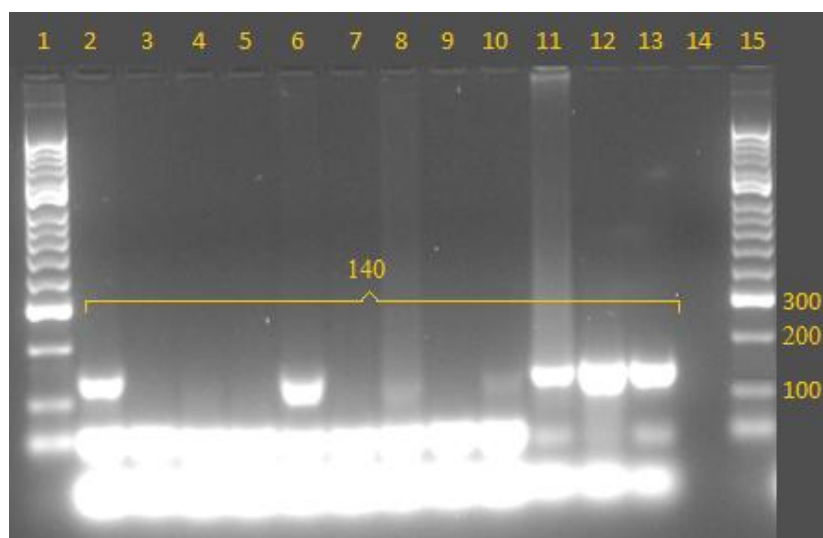
O gato 9, apesar de ter sido o animal que apresentou uma variação mais acentuada da carga proviral de FeLV, foi o único animal que a aumentou, enquanto 4 gatos diminuíram esta mesma carga ao longo do tratamento.

5. Efeito do Tratamento com rFeIFN- ω na Excreção de Vírus Presentes no Tracto Respiratório

5.1 Calicivírus Felino (FCV)

Ao dia 0 os gatos 1, 4, 6, e 7 testaram positivo à presença de FCV e os gatos 2, 3 e 5 negativo (Figura 7). Os restantes gatos, FeLV⁺ e co-infectados (FIV/FeLV⁺) testaram positivo a FCV ao dia 0.

Figura 7: Fotografia dos resultados da electroforese em gel de agarose relativos à presença de FCV nas excreções oronasais das amostras dos gatos de 1 a 7 (gatos FIV⁺) no dia 0.



Legenda: Poços 1 e 15 correspondem aos marcadores de pesos moleculares; poços 12 e 13 correspondem ao controlo positivo; poço 14 corresponde ao controlo negativo; poço 2 (gato 1), 6 (gato 4), 8 (gato excluído), 10 (gato 6) e 11 (gato 7) correspondem a amostras positivas; poços 3, 4, 5, 7 e 9 correspondem a amostras negativas.

No dia 10 os gatos 1, 9, 11, 14 e 16 apresentaram-se positivos quanto à presença de FCV enquanto os restantes foram negativos. Ao dia 30, assim como ao dia 65, todos os 16 gatos obtiveram um resultado negativo à pesquisa de FCV.

Tabela 24: Número de gatos, e respectiva percentagem, que se apresentaram a excretar FCV nos diferentes dias avaliados durante o tratamento.

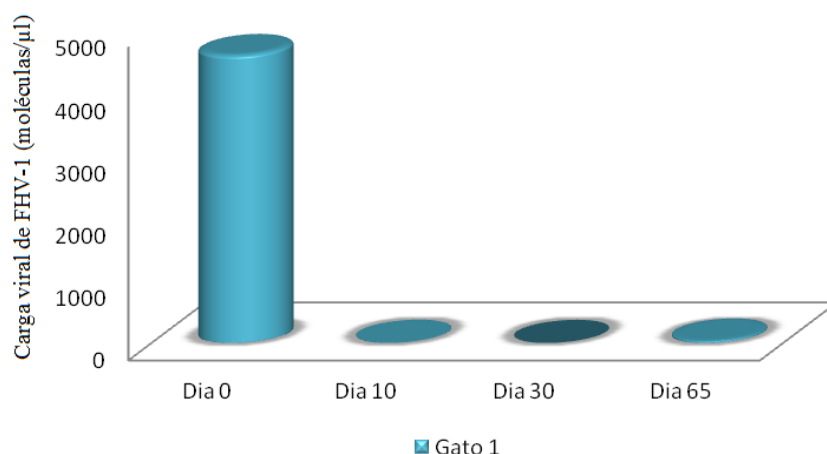
	Número de Gatos			Total	Percentagem
	FIV ⁺	FeLV ⁺	FIV/FeLV ⁺		
Dia 0	4	6	3	13	81%
Dia 10	1	3	1	5	31%
Dia 30	0	0	0	0	0%
Dia 65	0	0	0	0	0%

Inicialmente (dia 0) 13 gatos (81%) eram positivos à presença de FCV (4/7 FIV⁺, 6/6 FeLV⁺, 3/3 FIV/FeLV⁺), no dia 10 só já havia 5 gatos (31%) positivos (1/7 FIV⁺, 3/6 FeLV⁺ e 1/3 FIV/FeLV⁺) e nos dias 30 e 65 nenhum (0%) (Tabela 24).

5.2 Herpesvírus Felino tipo 1 (FHV-1)

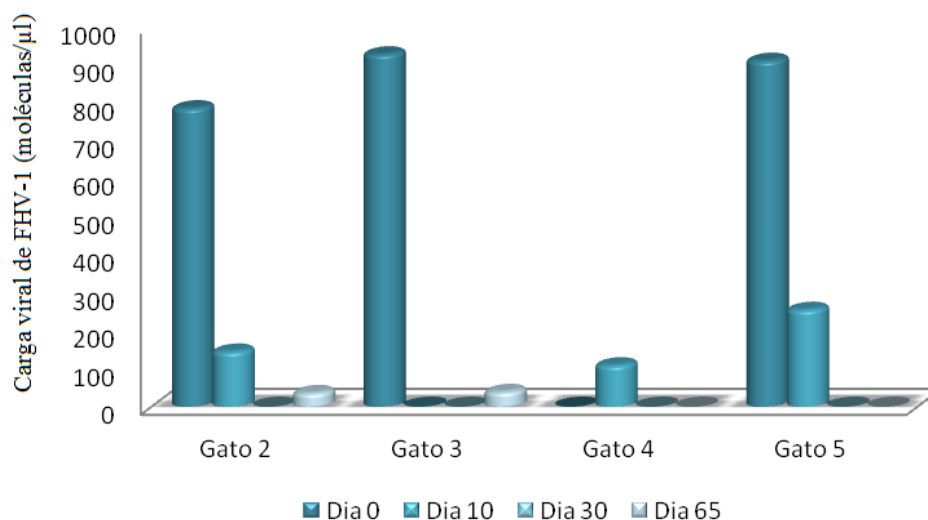
Os gatos 6 e 7 apresentaram-se sempre negativos à presença de FHV-1. O gato 1 diminuiu a carga viral de FHV-1 cerca de 130 vezes durante o tratamento (Gráfico 19).

Gráfico 19: Variação da carga viral de FHV-1 durante o tratamento no gato 1 (gato FIV⁺).



O gato 2 diminuiu a carga viral de FHV-1 cerca de 20 vezes durante o tratamento e o gato 3 cerca de 25 vezes (Gráfico 20). No gato 4 e no gato 5 a variação foi mais acentuada, de 10^2 e 9×10^2 respectivamente (Gráfico 20).

Gráfico 20: Variação da carga viral de FHV-1 durante o tratamento nos gatos 1, 3, 4 e 5 (gatos FIV⁺).



No grupo de gatos FeLV⁺ a diminuição da carga viral foi mais acentuada no gato 8 (10^3 vezes); no gato 10 (2×10^2); no gato 12 (2×10^2) e no gato 13 (6×10^2) enquanto que nos gatos 9 e 11 a carga viral diminuiu 25-50 vezes (Gráfico 21 e Gráfico 22).

Gráfico 21: Variação da carga viral de FHV-1 durante o tratamento nos gatos 8, 9, 11 e 13 (gatos FeLV⁺).

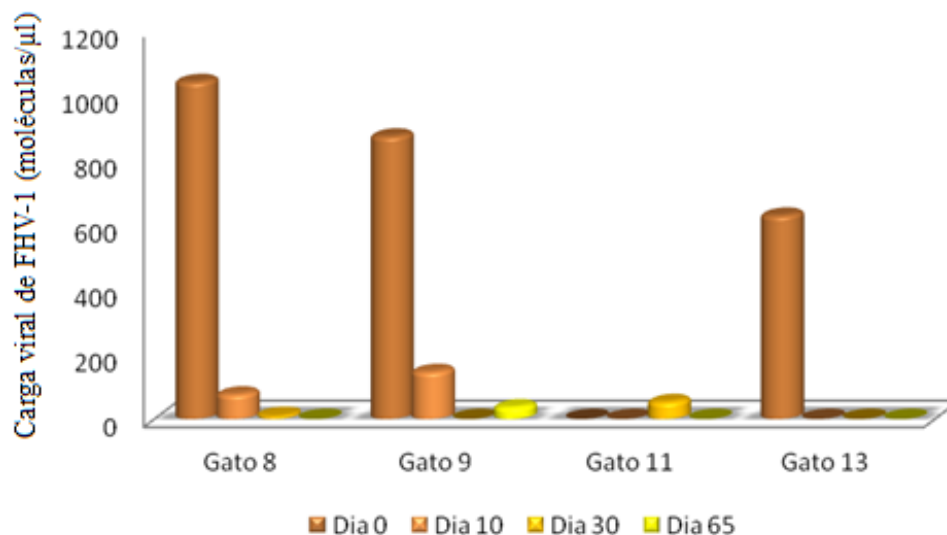
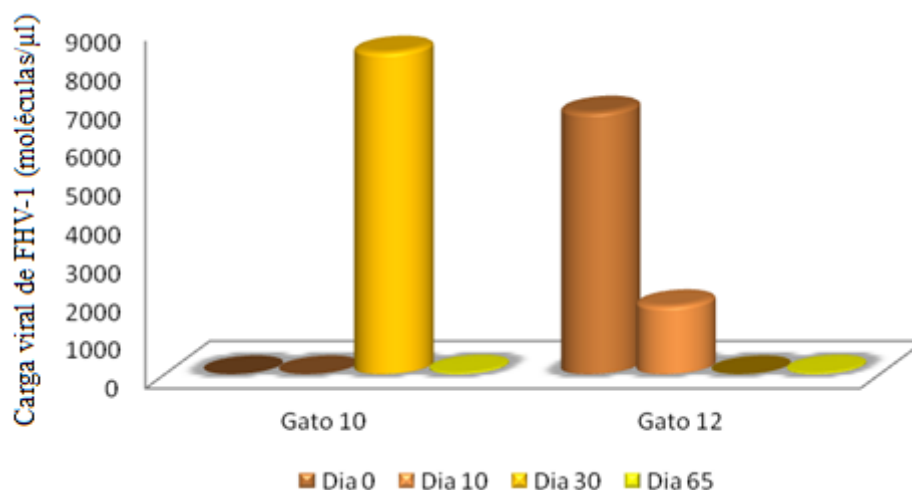
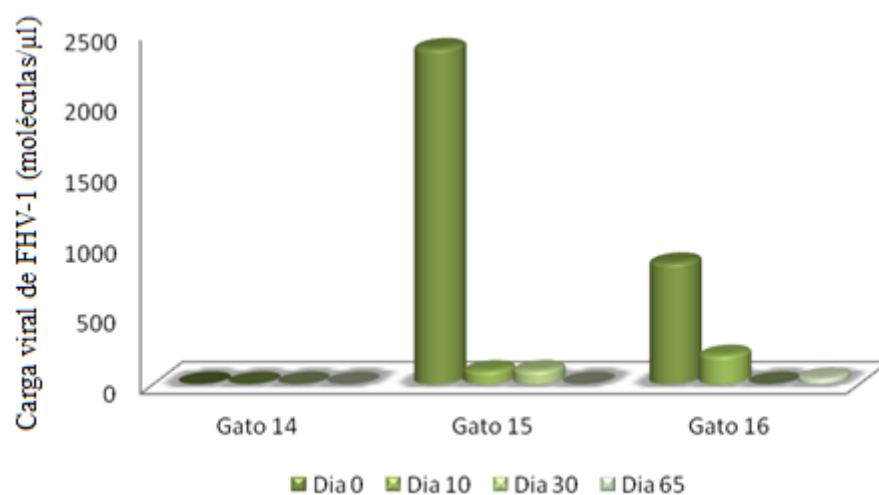


Gráfico 22: Variação da carga viral de FHV-1 durante o tratamento nos gatos 10 e 12 (gatos FeLV⁺).



No grupo de gatos co-infectados, o gato 14 apresentou-se sempre negativo à presença deste vírus nas 4 colheitas de amostras analisadas (Gráfico 23). Já o gato 15 diminuiu a carga viral de FHV-1 cerca de $2,4 \times 10^4$ vezes, mas o gato 16 só diminuiu 20 vezes durante o tratamento (Gráfico 23).

Gráfico 23: Variação da carga viral de FHV-1 durante o tratamento nos gatos FIV/FelV⁺.



A diminuição da concentração de FHV-1 presente nas secreções oronasais foi bastante significativa, pois os 13 gatos (100%), que apresentaram partículas virais de FHV-1 nas secreções oronasais em algum dia avaliado, diminuíram de modo evidente a carga viral ao longo do tratamento com rFeIFN- ω estando todos eles ao dia 65 com carga viral mínima ou nula.

DISCUSSÃO

Existe uma interação complexa entre os retrovírus, FIV e FeLV, e o hospedeiro (Hartmann, 2006). A imunodepressão induzida por estes vírus leva ao aparecimento de infecções secundárias, de sinais clínicos e de alterações da condição clínica geral que podem causar a morte do animal (de Mari et al., 2004). Está provado que o uso do IFN tipo I é benéfico no tratamento de algumas retrovirose. Este tipo de interferência mostrou inibir a replicação viral de HIV-1 (Shirazi & Pitha, 1992; Agy, Acker, Sherbert & Katze, 1995), induzir apoptose das células infectadas pelo vírus T-linfotrópico humano tipo I - HTLV-I (Feng et al., 2003) e reduzir a carga viral do vírus da leucemia murina - MuLV (Aboud et al., 1981). Quando utilizados no tratamento de gatos infectados por FIV ou por FeLV mostraram benefícios em aspectos como a taxa de sobrevivência, sintomatologia clínica e parâmetros hematológicos (de Mari et al., 2004; Pedretti et al., 2006; Collado et al., 2007; Doménech et al., 2011). Porém, são necessários mais estudos que analisem e ajudem a compreender melhor o efeito dos interferões no curso das infecções por FIV e por FeLV (de Mari et al., 2004; Collado et al., 2007; Lutz et al., 2009; Doménech et al., 2011). O presente estudo pretende avaliar o efeito do tratamento com interferão ômega recombinante de origem felina (rFeIFN- ω) em gatos infectados pelo FIV e/ou FeLV. Na tentativa de dispor de um conjunto significativo de parâmetros que pudessem ser avaliados antes, durante e no final da aplicação do rFeIFN- ω , após completado o tratamento recomendado, seleccionámos os seguintes: sinais clínicos; hemograma; proteinograma; parâmetros bioquímicos (ureia, creatinina, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase); carga de provírus de FeLV; excreção de calicivírus felino (FCV) e de herpesvírus felino (FHV-1) nas secreções oronasais; proteína C reactiva; excreção de parvovírus (FPV) e de coronavírus (FCoV) nas fezes; carga viral plasmática de FIV e de FeLV; carga de provírus de FIV; entre outros. O presente trabalho só abrange os seis primeiros.

1. Sinais Clínicos

Os sinais clínicos associados a estas doenças variam muito, dependendo da idade do animal no momento da exposição ao vírus, da eficácia da resposta do sistema imunitário, da exposição e possível co-infecção por outros agentes patogénicos, da patogenecidade do vírus, e do subtipo implicado na infecção, principalmente no FeLV (Hosie et al., 2009; Lutz et al., 2009; Hartmann, 2011). Observando os resultados do presente trabalho, onde 62,5% dos gatos apresentaram uma evolução clínica positiva, 31,1% mantiveram o seu quadro clínico e apenas 6,3% pioraram clinicamente, conclui-se que o tratamento com rFeIFN- ω induziu efeitos

notoriamente positivos no que respeita à sintomatologia clínica nos animais dos três grupos de gatos aqui estudados (FIV⁺, FeLV⁺ e FIV/FeLV⁺), sendo, no entanto, o grupo de gatos FIV⁺ o que melhor respondeu a este tratamento. Os animais que inicialmente possuíam sintomatologia clínica mais acentuada (CC elevada) foram os que mais beneficiaram com o tratamento, enquanto os gatos com sintomatologia ligeira ou assintomáticos (CC baixa) mantiveram-se estáveis. No grupo de gatos FeLV⁺, ao dia 10 e principalmente ao dia 30, observou-se um aumento da CC em alguns dos animais, sobretudo pelo agravamento das afecções respiratórias, o que pode dever-se às condições atmosféricas adversas que se fizeram sentir nos dias próximos dessas colheitas, uma vez que o gatil não está devidamente protegido do vento e da chuva. Todavia, ao dia 65 os animais recuperaram a sua CC que, no geral, registou valores mais baixos que no início do estudo. De entre os sinais clínicos, as patologias associadas à cavidade oral, tais como úlceras, gengivites e granulomas, referidas na bibliografia como os principais sinais clínicos associados a estas retrovirose (Collado et al., 2007; Lutz et al., 2007; Levy et al., 2008; Ravi et al., 2010; Hartmann, 2011), são as que parecem responder melhor ao tratamento, nos três grupos aqui estudados (FIV⁺, FeLV⁺ e FIV/FeLV⁺). Estas observações vão ao encontro dos resultados obtidos em estudos anteriores que concluem que tanto animais FeLV positivos, como animais co-infectados por FIV e FeLV apresentaram uma diminuição da taxa de mortalidade e melhorias ao nível clínico quando sujeitos a esta mesma terapêutica (de Mari et al., 2004). Um estudo mais recente, relata também uma melhoria da condição clínica dos animais infectados por estes retrovírus, principalmente naqueles com uma sintomatologia mais acentuada, quando tratados com rFeIFN- ω , enquanto que a condição clínica dos animais inicialmente sem sintomatologia ou com sintomatologia ligeira não sofreu alteração ao longo do tratamento (Doménech et al., 2011).

2. Hemograma

O FIV e o FeLV podem causar alterações hematológicas, sendo estas mais frequentes em animais com FeLV do que em animais com FIV (Gleich & Hartmann, 2009). Uma das principais alterações associadas a ambas as infecções é a anemia. A trombocitopénia pode também estar presente nestes animais. No presente estudo, os valores dos parâmetros relativos aos eritrogramas e à concentração plaquetária não variaram significativamente ao longo do tratamento. A concentração média de eritrócitos assim como o hematócrito diminuíram ligeiramente ao longo do tratamento em todos os três grupos de gatos (FIV⁺, FeLV⁺ e FIV/FeLV⁺), mas os seus valores médios estiveram sempre dentro do intervalo de valores de referência, inclusive no início do tratamento e, por isso, esta diminuição de valores, entre o

dia 0 e o dia 65, não se revelou estatisticamente significativa em nenhum dos grupos. Assim, não se pode afirmar que o rFeIFN- ω tenha alterado estes parâmetros. Estudos anteriores em gatos com FIV e/ou FeLV que possuíam parâmetros do eritrograma alterados, melhoraram quando tratados com rFeIFN- ω (de Mari et al., 2004; Doménech et al., 2011). Apesar de não se observar uma variação dos parâmetros do eritrograma no presente estudo, é de notar que os gatos possuíam, no início do tratamento, os valores dentro do intervalo de referência.

Os parâmetros do leucograma podem igualmente apresentar alterações em gatos infectados por FIV ou FeLV (Collado, 2006). Os principais alvos do FIV são os linfócitos e os macrófagos, sendo a linfopénia uma alteração hematológica frequentemente observada em gatos FIV⁺ (Gleich & Hartmann, 2009). As causas da diminuição da concentração de linfócitos incluem o decréscimo na sua produção devido à infecção da medula óssea e do timo, lise das células infectadas devido ao efeito citopático do vírus, destruição das células infectadas pelo sistema imunitário ou morte por apoptose (Hartmann, 2011). O FeLV pode causar pancitopénias, visto que o vírus pode infectar as células precursoras de todas as linhas celulares (Gleich & Hartmann, 2009). Estes animais podem apresentar também linfopénia que resulta principalmente da replicação do vírus no interior dos linfócitos (Hartmann, 2006). No presente trabalho os parâmetros do leucograma não se alteraram significativamente ao longo do tratamento em nenhum dos grupos. A concentração média de leucócitos aumentou no grupo de gatos FIV⁺ e FeLV⁺, mas diminuiu nos gatos co-infectados ao longo do tratamento, no entanto, nenhuma destas variações foi muito acentuada, apresentando sempre valores médios dentro do intervalo de valores de referência. Apenas dois dos dezasseis gatos (2/16) terminaram o tratamento com leucocitose ligeira e outros dois (2/16) com leucopénia ligeira, sendo os quatro FeLV⁺. A concentração média de linfócitos diminuiu ligeiramente em todos os grupos de gatos estudados, contudo os valores médios estiveram também sempre dentro do intervalo de valores de referência ao longo do tratamento. As concentrações médias de neutrófilos e monócitos mantiveram-se sempre dentro do intervalo de valores de referência ao longo do tratamento. Nenhuma das variações dos parâmetros do leucograma se mostrou estatisticamente significativa pelo que se não pode afirmar que o rFeIFN- ω tenha influenciado os parâmetros relativos ao leucograma. Em estudos onde se avaliou a variação dos parâmetros do leucograma em gatos com FIV e FeLV tratados com rFeIFN- ω foi observado que os parâmetros hematológicos com registos fora do intervalo de valores de referência antes do tratamento, como leucocitose e linfopénia, reverteram para valores normais com o tratamento (de Mari et al., 2004; Doménech et al., 2011). Apesar de não se observar uma variação acentuada destes parâmetros no presente estudo, é de notar que os gatos já possuíam, no início do tratamento os valores dentro do intervalo de referência.

A aplicação de rFeIFN- ω não induziu alterações no hemograma, uma vez que os valores deste se mantiveram dentro do intervalo de valores de referência ao longo do tratamento, ao contrário do que acontece durante a aplicação de outros fármacos utilizados no tratamento destas afecções, como o AZT, que induzem com frequência alterações no hemograma (Lutz et al., 2009).

3. Proteinograma

No presente estudo, a concentração média de proteínas totais (PTs) nos gatos FIV⁺, manteve-se elevada ao longo de todo o tratamento devido, provavelmente à hipergamaglobulinémia exibida por estes animais. A concentração média de globulina- γ , comparando o dia 0 com o dia 65, aumentou, embora sem relevância estatística. Num estudo recente onde se aplicou rFeIFN- ω em gatos com FIV e FeLV, apenas se observou uma tendência ligeira, mas não sustentada, para a diminuição da concentração da globulina- γ (Doménech et al., 2011). A hipergamaglobulinémia evidente nos gatos infectados com FIV no presente estudo está de acordo com resultados obtidos noutros estudos (Shelton et al., 1995; Collado et al., 2007; Gleich & Hartmann, 2009). A hipergamaglobulinémia presente nos gatos FIV⁺ no início do tratamento poderá ser explicada pela hiperestimulação do sistema imunitário com hiperactivação dos linfócitos B. Esta hiperestimulação do sistema imunitário pode dever-se à presença de infecções secundárias e oportunistas associadas ao FIV, e também à estimulação directa exercida por este retrovírus, pois num estudo experimental observou-se hipergamaglobulinémia em gatos que não estiveram expostos a outros agentes patogénicos mas unicamente ao FIV (Gleich & Hartmann, 2009). Apesar de no dia 0 os animais já apresentarem uma hipergamaglobulinémia a concentração da globulina- γ ainda aumentou durante o tratamento. Este aumento pode dever-se à nova estimulação do sistema imunitário por acção do rFeIFN- ω .

Durante o tratamento, as concentrações médias de PTs e de globulina- γ apresentaram-se mais baixas nos gatos FeLV⁺ do que nos gatos FIV⁺, mas dentro do intervalo de valores de referência. No grupo dos co-infectados a concentração da globulina- γ diminuiu nos dois animais que apresentavam hipergamaglobulinémia no início do tratamento, para uma concentração dentro do intervalo de valores de referência e no outro animal co-infectado a concentração também diminuiu mas para valores abaixo do de referência. A concentração média destas globulinas diminuiu tanto nos gatos FeLV⁺ como nos co-infectados, mas nenhuma destas variações foi estatisticamente significativa; ao passo que a diminuição da concentração das PTs no grupo de gatos FeLV⁺ foi estatisticamente significativa ($p=0,042$). Em estudos anteriores onde gatos com FIV e FeLV foram tratados com rFeIFN- ω não houve

uma diminuição relevante da concentração desta globulina (Doménech et al., 2011). A observação de valores pouco alterados da globulina- γ nos animais FeLV⁺ no início do tratamento está de acordo com estudos anteriores onde se avaliaram as alterações hematológicas e serológicas em gatos com FIV e FeLV e se concluiu que, em contraste com gatos infectados com FIV, raramente são observadas alterações nas concentrações de globulina- γ e PTs em gatos com FeLV (Gleich & Hartmann, 2009). Embora as infecções secundárias sejam comuns e causem uma estimulação antigénica persistente, a resposta humoral dos gatos infectados por FeLV pode encontrar-se diminuída devido principalmente a uma progressiva disfunção dos linfócitos T (Diehl & Hoover, 1992) que pode levar à diminuição da produção de factores de estimulação dos linfócitos B (Hartmann, 2006); consequentemente, a hipergamaglobulinémia é pouco comum nestes gatos (Gleich & Hartmann, 2009). As variações observadas na concentração de globulina- γ nos grupos de gatos FIV⁺ e FeLV⁺, apesar de não serem estatisticamente significativas, podem ser indicativas de uma influência positiva da aplicação do rFeIFN- ω na infecção por FIV e por FeLV em gatos. O aumento da concentração destas globulinas durante o tratamento no grupo de gatos FIV⁺ pode estar associado à indução da produção de anticorpos neutralizantes contra FIV. A diminuição da concentração destas globulinas durante o tratamento no grupo de gatos FeLV⁺ pode também ser indicativo dos benefícios do rFeIFN- ω devido a uma possível diminuição da estimulação antigénica relacionada com o combate das infecções existentes no organismo, pois as infecções secundárias, avaliadas neste estudo, foram controladas com eficácia. No entanto o completo esclarecimento exige avaliar as concentrações de proteínas inflamatórias e de citocinas envolvidas na resposta imunitária celular e humoral e relacioná-las com as concentrações destas globulinas.

A concentração de albumina no sangue, no geral, não variou de modo relevante ao longo do tratamento, mantendo-se dentro do intervalo de valores de referência; apenas dois gatos terminaram com uma hiperalbuminémia ligeira (gatos FIV⁺); um gato que inicialmente apresentou uma concentração normal, no fim possuía uma ligeira hipoalbuminémia (gato FeLV⁺); dois gatos que partiram de uma hiperalbuminémia terminaram o tratamento com esta concentração dentro dos valores de referência (gatos FIV/FeLV⁺). A variação do valor médio da albuminémia entre o dia 0 e o dia 65 só foi estatisticamente significativa ($p=0,046$) nos gatos FeLV⁺, embora os valores estivessem no geral sempre dentro do intervalo de valores de referência.

A concentração sérica da globulina alfa 1 (globulina- $\alpha 1$) encontrava-se estatisticamente mais baixa nos gatos FIV⁺ em comparação com os gatos FeLV⁺ e co-infectados ($p < 0,05$) no dia 0, pois todos os animais FIV⁺ possuíam estas globulinas em concentrações abaixo do valor de

referência. A concentração desta globulina aumentou ao longo do tratamento no grupo de gatos FIV⁺ e também nos gatos FeLV⁺, mas diminuiu nos co-infectados; apenas o aumento no grupo de gatos FIV⁺ se revelou estatisticamente significativo ($p=0,048$) e quatro gatos passaram a possuir esta concentração dentro do intervalo de valores de referência no dia 65.

A concentração sérica da globulina alfa 2 (globulina- α_2) esteve sempre acima dos valores de referência em todos os dezasseis animais, tanto no início do tratamento como no fim, à excepção do gato 7 que apresentou uma concentração normal ao dia 65. A concentração destas globulinas aumentou nos gatos FIV⁺ e diminuiu tanto nos gatos FeLV⁺ como nos co-infectados durante o tratamento, no entanto nenhuma destas variações se revelou estatisticamente significativa.

A concentração sérica da globulina beta (globulina- β) aumentou no grupo de gatos FIV⁺ e diminuiu tanto nos FeLV⁺ como nos co-infectados. Nos gatos FeLV⁺ a concentração desta globulina encontrava-se abaixo do valor mínimo de referência em seis dos sete gatos ao dia 0 e no dia 65 todos os sete gatos possuíam uma concentração desta globulina abaixo do valor mínimo de referência. A variação da concentração desta globulina no grupo FeLV⁺, quando comparadas as concentrações no dia 0 com o dia 65, foi estatisticamente significativa ($p=0,027$).

Estas globulinas são proteínas inflamatórias e as suas concentrações podem estar aumentadas em processos infecciosos e inflamatórios (Taylor et al., 2010). A utilização do rFeIFN- ω , ao potenciar a resposta imunitária, poderá ter induzido o aumento crescente das suas concentrações nos gatos FIV⁺. Nos outros grupos este aumento não foi observado o que poderá ser um indicador de um maior comprometimento do sistema imunitário nestes gatos.

4. Parâmetros Bioquímicos

Todos os animais do presente estudo revelaram manutenção da função renal, tendo apresentado sempre os valores de ureia e creatinina dentro do intervalo de valores de referência ao longo do tratamento. No que diz respeito à função hepática, também não houve alteração significativa dos valores de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) ao longo do tratamento, pois apenas um gato apresentou ao dia 65 uma concentração de AST acima do valor máximo de referência. Estes parâmetros não variaram significativamente com o tratamento. Assim, podemos dizer que o rFeIFN- ω parece não influenciar a função renal e hepática avaliada a partir destes parâmetros bioquímicos.

5. Carga de Provírus de FeLV

Não se verificou um padrão na evolução da carga de provírus de FeLV ao longo do tratamento com rFeIFN- ω nos animais do presente estudo. A carga proviral expressa o número de genomas virais integrados no genoma das células hospedeiras infectadas (Lutz et al., 2009). A diminuição desta carga, e eventualmente a eliminação de provírus do organismo, implica a eliminação das células infectadas (Bendinelli et al., 1995; Hosie et al., 2009). Sabe-se que o IFN tipo I (IFN- α , IFN- β e IFN- ω) quando se liga aos receptores celulares desencadeia uma sequência de acontecimentos que levam à activação da resposta imunitária. As acções do IFN-I incluem a redução da velocidade de proliferação da infecção no organismo; redução das alterações estruturais e funcionais das células infectadas; indução da activação de endonucleases que degradam ARN mensageiro viral e inactivação das proteínas envolvidas na transcrição (Collado et al., 2006). Por outro lado, o IFN também parece activar células do sistema imunitário como as células NK, os linfócitos T citotóxicos e os macrófagos que podem ser responsáveis pela morte das células infectadas (Samuel, 2001); diminuindo o número de células infectadas também diminuiria a carga proviral de FeLV por volume de sangue; de acordo com isto se o rFeIFN- ω tiver uma acção antiviral sobre o FeLV, desencadeará através do sistema imunitário inato e/ou adaptativo uma redução do número de células infectadas e, por esse motivo, a carga proviral no interior do organismo deverá tendencialmente, ao longo do tempo em que a acção antiviral se fizer sentir, diminuir também. Num estudo de 2007 concluiu-se que os IFNs testados, rHuIFN- α e rFeIFN- ω , afectaram o ciclo do FeLV a um nível pós-transcricional, e, tal como em outras viroses, apesar da síntese de proteínas não ter sido alterada, a aplicação destes IFNs induziu uma pequena ou mesmo nula libertação de viriões infecciosos, limitando a disseminação da infecção para outras células (Collado et al., 2007). Para além disto, este estudo mostrou que os IFNs parecem actuar sinergicamente com o vírus aumentando a apoptose selectiva de células infectadas (Collado et al., 2007). Apesar de não podermos afirmar que o tratamento induziu uma redução da carga proviral de FeLV é de notar que 44,5% dos gatos (n=4) diminuíram a sua carga proviral e o mesmo número de animais (n=4) mantiveram-na, enquanto apenas 11% (n=1) a aumentou durante a aplicação de rFeIFN- ω o que pode sugerir que o tratamento influenciou positivamente o curso da infecção por FeLV, sendo contudo necessário não ignorar ou minorar a situação do gato 9 que aumentou drasticamente a sua carga proviral ao longo do tratamento. No entanto, em estudos anteriores onde se avaliaram as variações da carga de provírus de FeLV e de FIV durante a aplicação de rFeIFN- ω não foi observada uma diminuição consistente da carga proviral de nenhum dos vírus (Doménech et al., 2011). A variação da

carga proviral de FeLV parece menos estudada do que a variação na infecção por FIV e o número de trabalhos publicados é pequeno. É ainda de referir que parece haver uma correlação entre a variação da CC e a variação da carga proviral de FeLV, pois o único animal que aumentou de maneira acentuada a sua carga proviral foi também o único gato que piorou clinicamente durante o tratamento, tendo sido hospitalizado no fim deste (gato 9). Os quatro animais que diminuíram a carga proviral de FeLV diminuíram também a sua CC ou mantiveram-se com sintomatologia ligeira durante a aplicação do rFeIFN- ω . Os outros gatos que mantiveram os níveis de carga proviral de FeLV mantiveram uma CC baixa ou diminuíram-na ligeiramente. Assim, parece que a melhoria na sintomatologia clínica pode não estar apenas relacionada com o controlo das viroses secundárias, mas também com o controlo da infecção por FeLV.

Outro parâmetro que nos ajudaria a analisar se o rFeIFN- ω afecta o curso da doença retroviral (FIV ou FeLV) seria a avaliação da variação da carga viral plasmática destes dois vírus (resultados em curso). A quantificação da carga viral plasmática e da carga proviral são ambos parâmetros importantes para a avaliação da progressão de doenças provocadas por retrovírus (Tandon et al., 2005). Estes dados permitem-nos medir objectivamente algum efeito do rFeIFN- ω nas infecções por FIV e FeLV e esclarecer se apenas melhora a resposta imunitária enquanto imunomoduladora ou avaliar se exerce algum efeito directo sobre a expressão viral (Collado et al., 2007). Existem poucos estudos que analisem o efeito terapêutico do rFeIFN- ω em gatos com FIV e/ou FeLV que contribuam para esclarecer se este possui um carácter anti-FIV e/ou anti-FeLV e não apenas a inibição de infecções secundárias *in vivo* (de Mari et al., 2004) já que *in vitro* está demonstrado que inibe a replicação viral de FeLV (Lutz et al., 2009; Hosie et al., 2009).

O completo esclarecimento dos benefícios da aplicação deste tratamento exige avaliar, para além da variação da carga viral plasmática de FIV e de FeLV, a variação da resposta imunitária com aplicação do rFeIFN- ω , nomeadamente as variações das concentrações de proteínas inflamatórias e de citocinas envolvidas na resposta imunitária celular e humoral (resultados em curso) e relacioná-las com as variações dos parâmetros clínicos analisados assim como com a variação da carga viral plasmática.

6. Infecções Virais Concomitantes

A maioria dos sinais clínicos em gatos com FIV e com FeLV são causados pelas infecções secundárias que se instalam beneficiando da imunodepressão causada pelo FIV e pelo FeLV (Levy et al., 2008; Hosie et al., 2009; Hartmann, 2011). Neste estudo foi avaliada a presença

de FCV e quantificada a excreção de FHV-1 pois são vírus concomitantes frequentemente presentes no tracto respiratório de gatos imunodeprimidos. A análise dos resultados revela que houve uma redução significativa da carga viral de ambos os vírus (FCV e FHV-1) em todos os três grupos estudados (FIV⁺, FeLV⁺ e FIV/FeLV⁺). Relativamente ao FCV, no início do tratamento havia 81% dos gatos (n=13) positivos pela técnica de PCR, ao dia 10 apenas 31% (n=5) e tanto ao dia 30 como ao dia 65, nenhum animal se revelou positivo à detecção deste vírus por PCR (0%). Todos os animais infectados por FIV e/ou por FeLV que nalgum momento, durante o tratamento, excretaram partículas de FHV-1 também diminuíram essa excreção para níveis praticamente indetectáveis por PCR em Tempo Real no final do tratamento. O gato 10 aumentou a carga viral de FHV-1 ao dia 30, quando comparada com a carga viral inicial, e a sua CC neste dia esteve mais elevada que em qualquer dos outros dias, o que parece indicar que o aumento da CC possa estar relacionada com o aumento da carga viral de FHV-1. Alguns dos principais sintomas associados ao FCV são estomatites, erosões e ulcerações orais, espirros, corrimentos nasais e hipersalivação (Collado et al., 2006; Radford et al., 2009) enquanto que para o FHV-1 os sinais clínicos incluem: rinite, conjuntivite, corrimentos nasais e oculares, úlceras da córnea e, apesar de menos frequente, úlceras orais, e outras patologias orais (Collado et al., 2006; Thiry et al., 2009). A melhoria clínica observada nos animais durante o presente estudo poderá ser um efeito directo e positivo do tratamento sobre FCV e FHV-1; de acordo com estudos anteriores onde se aplicou o rFeIFN- ω em gatos com doenças respiratórias agudas e crónicas que possuíam como principal agente etiológico estes dois vírus (FCV e FHV-1) verificou-se igualmente uma redução dos sinais clínicos destas doenças (Collado et al., 2006; Hennet, Camy, McGahie & Albouy, 2011). Noutro estudo foi também demonstrado que a aplicação de rFeIFN- ω em gatos infectados por FCV apresentou uma elevada eficácia terapêutica (Ninomiya et al., 1999). A aplicação tópica ocular de rFeIFN- ω em animais com sintomatologia ocular provocada por FHV-1 promoveu igualmente uma melhoria clínica importante (Verneuil, 2004). Este interferão está inclusive licenciado para o tratamento de FCV no Japão, Austrália e Ásia (Hennet et al., 2011).

O controlo das infecções concomitantes conseguido por este tratamento, FCV e FHV-1, associadas à infecção por FIV e/ou FeLV, é importante, não só porque promove uma melhoria da qualidade de vida dos animais como diminui o risco de contágio em locais com elevadas densidades populacionais, nomeadamente gatis e centros de criação. A utilização de rFeIFN- ω nestes locais onde o risco de contágio é acrescido (Radford et al., 2009; Thiry et al., 2009) pode desempenhar um papel importante ao diminuir a disseminação viral e facilitar a manutenção do estado hígido dos gatos nestes locais de difícil manejo.

Não foram observados efeitos adversos relativos à aplicação de rFeIFN- ω nos animais do presente estudo, o que está de acordo com estudos anteriores onde não foram observadas diferenças significativas entre os sinais dos gatos tratados com rFeIFN- ω em comparação com os gatos do grupo controlo (de Mari et al., 2004).

Finalmente é de referir que não há garantias de que as melhorias clínicas observadas durante e após a aplicação do rFeIFN- ω e realçadas neste estudo, se possam manter sustentadamente durante o resto da vida do animal, podendo haver necessidade de novos tratamentos no futuro.

CONCLUSÃO

Até à data, o efeito do rFeIFN- ω , nas infecções por FIV e FeLV *in vivo* continua por clarificar, já que não se conseguiu provar a sua actividade antiviral inata e/ou imunomoduladora sobre estas viroses (Gerlach et al., 2009; Doménech et al., 2011). O presente trabalho sugere que há um efeito positivo nítido na sintomatologia e na condição clínica dos animais de todos os grupos, mas principalmente dos gatos FIV⁺, que parece ser devida pelo menos em parte aos efeitos notoriamente positivos no combate a infecções secundárias. Este facto pode ser de grande importância para a melhoria da qualidade de vida e manejo de gatos infectados com FIV e com FeLV, visto estes animais serem muito susceptíveis a infecções secundárias e serem elas muitas vezes as responsáveis pelo declínio do estado hígido geral destes animais. Este controlo é muito importante em locais com elevadas densidades populacionais, como gatis, onde a melhoria clínica e diminuição da excreção de vírus concomitantes pode ser decisiva para um bom manejo. Os hemogramas não se alteraram significativamente durante a aplicação de rFeIFN- ω , visto que os valores deste já se encontravam dentro do intervalo de valores de referência no início do tratamento e assim se mantiveram ao longo deste. Esta observação sugere que a aplicação do rFeIFN- ω não induz alterações negativas no hemograma; outros estudos já haviam confirmado a melhoria de parâmetros do hemograma em gatos infectados por FIV e/ou FeLV que se encontravam alterados, quando tratados com rFeIFN- ω (de Mari et al., 2004; Doménech et al., 2011). As funções renal e hepática também não sofreram alterações significativas durante o tratamento com rFeIFN- ω , estando os parâmetros bioquímicos, relacionados com a avaliação destas funções, dentro dos intervalos de valores de referência. Apesar das variações observadas nos proteinogramas parecerem indicar uma influência positiva da aplicação do rFeIFN- ω , o seu completo esclarecimento exige avaliar as variações das concentrações de proteínas inflamatórias e de citocinas produzidas na resposta celular e humoral e relacioná-las com as concentrações das globulinas (resultados em curso). A avaliação do efeito terapêutico da aplicação de rFeIFN- ω no combate à infecção por FIV e por FeLV, e os seus efeitos no sistema imunitário destes gatos, pode ser efectuado pela quantificação da carga viral plasmática (resultados em curso), da carga proviral (Doménech et al., 2011) e da análise da variação das concentrações de proteínas inflamatórias e de citocinas produzidas na resposta celular e humoral (resultados em curso). No presente estudo foi apenas avaliada a evolução da carga proviral de FeLV e esta não variou significativamente segundo uma tendência em todos os gatos; no entanto, apenas um animal aumentou a carga de provírus de FeLV, sugerindo que o rFeIFN- ω pode influenciar o curso da infecção por FeLV, contudo é necessário a avaliação dos restantes resultados em cursos para a esclarecer completamente.

Face aos resultados deste estudo, parece recomendável que gatos infectados por FIV e por FeLV e com sintomatologia clínica associada sejam tratados com rFeIFN- ω .

BIBLIOGRAFIA

- Aboud, M., Kimchi, R., Bakhanashvili, M. & Salzberg, S. (1981). Intracellular production of virus particles and viral components in NIH/3T3 cells chronically infected with Moloney murine leukemia virus: effect of interferon. *The Journal of Virology*, 40, 830–838.
- Addie, D.D., Dennis, J.M., Toth, S., Callanan, J.J., Reid, S. & Jarrett, O. (2000). Long-term impact on a closed household of pet cats of natural infection with feline coronavirus, feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus. *Veterinary Record*, 146, 419-424.
- Agy, M.B., Acker, R.L., Sherbert, C.H. & Katze, M.G. (1995). Interferon treatment inhibits virus replication in HIV-1- and SIV-infected CD4+ T-cell lines by distinct mechanisms: evidence for decreased stability and aberrant processing of HIV-1 proteins. *Virology*, 214, 379–386.
- Allison, R.W. & Hoover, E.A. (2003). Feline immunodeficiency virus is concentrated in milk early in lactation. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 19(3), 245–53.
- Anderson, M.M., Lauring, A.S., Robertson, S., Dirks, C. & Overbaugh, J. (2001). Feline Pit2 functions as a receptor for subgroup B feline leukemia viruses. *The Journal of Virology*, 75(22), 10563–72.
- Arai, M., Darnen, J., Lewis, A. & Yamamoto, J.K. (2000). The use of human hematopoietic growth factors (rhGM-CSF and rhEPO) as a supportive therapy for FIV-infected cats. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 77, 71-92.
- Arai, M., Earl, D.D. & Yamamoto, J.K. (2002). Is AZT/3TC therapy effective against FIV infection or immunopathogenesis? *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 85, 189-202.
- Arjona, A., Barquero, N., Doménech, A., Tejerizo, G., Collado, V.M., Toural, C., Martín, D., & Gomez-Lucia, E. (2007). Evaluation of a novel nested PCR for the routine diagnosis of feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV). *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 9, 14-22.
- Bachmann, M.H., Mathiason-Rubard, C., Learn, G.H., Rodrigo, A.G., Sodora, D.L., Mazzetti, P., Hoover, E.A. & Mullins J.I. (1997). Genetic diversity of feline immunodeficiency virus: dual infection, recombination, and distinct evolutionary rates among envelope sequence clades. *The Journal of Virology*, 71, 4241-4253.
- Bannasch, M.J. & Foley, J.E. (2005). Epidemiologic evaluation of multiple respiratory pathogens in cats in animal shelters. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 7:109-19.
- Bendinelli, M., Pistello, M., Lombardi, S., Poli, A., Garzelli, C., Matteucci, D., Ceccherini-Nelli, L., Mavaldi, G., & Tozzini, F. (1995). Feline immunodeficiency virus: an interesting model for AIDS studies and an important cat pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 8 (1), 87-112.

- Bienze, D., Reggeti, F., Wen, X., Little, S., Hobson, J., & Kruth, S. (2004). The variability of serological and molecular diagnosis of feline immunodeficiency virus infection. *The Canadian Veterinary Journal*, 45(9), 753-757.
- Binns, S.H., Dawson, S., Speakman, A.J., Cuevas, L.E., Hart, C.A., Gaskell, C.J., Morgan, K.L. & Gaskell, R.M. (2000). A study of feline upper respiratory tract disease with reference to prevalence and risk factors for infection with feline calicivirus and feline herpesvirus. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 2:123-33.
- Caney, S., Helps, M.A., Finerty, C.R., Tasker, S. & Gruffydd-Jones, T.J. (2003). Treatment of asymptomatic chronically FIV-infected cats with recombinant feline 5 interferon omega. *Proceedings of the annual conference of the American College of Veterinary Internal Medicine*. June 4 to 8. Charlotte, USA.
- Caney, S. (2005). Antiviral therapy in cats: current rationale and recommendations. *In Practice*, 27, 454-457.
- Cheng, H.H., Anderson, M.M. & Overbaugh, J. (2007). Feline leukemia virus T entry is dependent on both expression levels and specific interactions between cofactor and receptor. *Virology*, 359, 170-178.
- Chow, J.T., Williamson, D.A., Yates, K.M., & Goux, W.J. (2005). Chemical characterization of the immunomodulating polysaccharide of Aloe vera L. *Carbohydrate Research*, 340, 1131-1142.
- Cohn, L.A. (2007). Update on serologic testing for infectious disease in cats. *Proceedings of the scivac 56th International Congress: Rimini*, 1-3 Junho, pp. 19-21.
- Collado, V.M., Doménech, A., Gómez-Lucía, E., Tejerico, G. & Corrales, G.M. (2006). Usos del interferon en la clínica de pequeños animales. *Pequeños Animales*, 63, 65-71.
- Collado, V.M., Gómez-Lucía, E., Tejerico, G., Escolar, E., Martin, S. & Doménech, A. (2007). Effect of Type I interferons on the expression of feline leukemia virus. *Veterinary Microbiology*, doi:10.1016/j.vetmic.2007.03.008.
- Crawford, P.C., & Levy, J.K. (2007). New challenges for the diagnosis of feline immunodeficiency virus infection. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice*, 37, 335-350.
- De Marie, K., Maynard, L., Sanquer, A., Lebreux, B. & Eun H.-M. (2004). Therapeutic Effects of Recombinant Feline Interferon- γ on Feline Leukemia Virus (FeLV)-Infected and FeLV/Feline Immunodeficiency Virus (FIV)-Coinfected Symptomatic Cats. *Journal Veterinary International Medicine*, 18, 477-482.
- Diehl, L.J. & Hoover, E.A. (1992). Early and progressive helper T-cell dysfunction in feline leukemia virus-induced immunodeficiency. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 5, 1188–1194.
- Doménech, A., Miró, G., Collado, V.M., Ballesteros, N., Sanjosé, L., Escolar, E., Martin, S., & Gomez-Lucia, E. (2011). Use of recombinant interferon omega in feline retrovirogenesis: from theory to practice. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, doi:10.1016/j.vetimm.2011.06.008.

- Duarte, A. & Tavares, L. (2006). Phylogenetic analysis of Portuguese Feline Immunodeficiency virus sequences reveals high genetic diversity. *Veterinary Microbiology*, 114(1-2), 25-33. doi:10.1016/j.vetmic.2005.11.056
- Dunham, S.P. (2006). Lessons from the cat: development of vaccine against lentivirus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 112, 67-67.
- Dunham, S.P. & Graham, E. (2008). Retroviral Infections of Small Animals. *Veterinary Clinics Small Animal Practice*, 38, 879-901.
- Egberink, H.F., De Clercq, Van Vliet, A.L., E., Balzarini, J., Bridger, G.J., Henson, G., Horzinek, M.C. & Schols, D. (1999). Bicyclams, selective antagonists of the human chemokine receptor CXCR4, potently inhibit feline immunodeficiency virus replication. *The Journal Virology*, 73:6346-6352.
- Feng, X. (2008). Ratner, L. Human T-cell leukemia virus type 1 blunts signaling by interferon α . *Virology*, 374, 210-216.
- Feng, X., Heyden, N.V. & Ratner, L. (2003). Alpha interferon inhibitshuman T-cell leukemia virus type 1 assembly by preventing Gag interaction with rafts. *J. Virol*, 77, 13389–13395.
- Frey, S.C., Hoover, E.A. & Mullins, J.I. (2001). Feline immunodeficiency virus cell entry. *The Journal of Virology*, 75:5433-5440.
- Fulton, R.W. & Burge, L.J. (1985). Susceptibility of feline herpesvirus 1 and a feline calicivirus to feline interferon and recombinant human leukocyte interferons. *Antimicrob Agents Chemother*, 28, 698-699.
- Gerlach, N., Gibbert, K., Christina Alter, C., Nair, S., Zelinskyy, G., James, C.M. & Dittmer, U. (2009). Anti-retroviral effects of type I IFN subtypes in vivo. *Eur. Journal of Immunology*, DOI: 10.1002/39: 136–146.
- Gleich, S. & Hartmann, K. (2009). Hematology and serum biochemistry of feline immunodeficiency virus-infected and feline leukemia virus infected cats. *Journal Veterinary International Medicine*, 23, 552–558.
- Gomes-Keller, M.A., Tandon, R., Gönczi, E., Meli, M.L., Hofmann-Lehmann, R. & Lutz, H. (2006). Shedding of feline leukemia virus RNA in saliva is a consistent feature in viremic cats. *Veterinary Microbiology*, 112, 11-21.
- Gómez-Lucía, E., Collado, V.M., Miró, G. & Doménech, A. (2009). Effect of Type-I Interferon on Retroviruses. *Viruses*, 1, 545-573, doi:10.3390/v1030545.
- Greene, W.K., Meers, J., Chadwick, B., Carnegie, P.R. & Robinson, W.F. (1993). Nucleotide sequences of Australian isolates of the feline immunodeficiency virus: comparison with other feline lentiviruses. *Archives Virology*, 132, 369-379.
- Guillermo Couto, C. (2001). What is new on feline lymphoma?. *Journal of Feline Medicine Surgery*, 3(4), 171–6.

- Hardy, W.D (1981). Haematopoietic tumours of cats. *J Am Anim Hosp Assoc*, 17, 921–40.
- Hartmann, K. (2004). Disease 1: Feline leukemia virus infection. In K. de Mari (Ed.), *Veterinary Interferon Handbook*. (pp.36-47). UK: Virbac, S.A.
- Hartmann, K. (2006). Feline Leukemia Virus Infection. In *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, Revised Reprint (3rd ed., pp. 105-131). St Louis, Missouri: Saunders.
- Hartmann, K. (2011). Clinical aspects of feline immunodeficiency and feline leukemia virus infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 143, 190-20
- Hartmann, K., Block, A., Ferk, G., Beer, B., Vollmar, A., & Lutz, H. (1999). Treatment of feline leukemia virus (FeLV) infection. *Veterinary Microbiology*, 69, 111-113.
- Hartmann, K., Griessmayr, P., Schulz, B., Greene, C.E., Vidyashankar, A.N., Jarrett, O., & Egberink, H.F. (2007). Quality of different in-clinic test systems for immunodeficiency virus and leukemia virus infection. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 9, 439-445.
- Hayward, J.J., Taylor, J. & Rodrigo, A.G. (2007). Phylogenetic analysis of feline immunodeficiency virus in feral and companion domestic cats of New Zealand. *The Journal of Virology*, 81(6), 2999-3004.
- Heit, B., Jones, G., Knight, D., Antony, J.M., Gill, M.J., Brown, C., Power, C. & Kubes, P. (2006). HIV and other lentiviral infections cause defects in neutrophil chemotaxis, recruitment, and cell structure: immunorestorative effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Journal Immunology*, 177, 6405–6414.
- Helfer-Hungerbuehler, K., Cattori, V., Bachler, B., Hartnack, S., Riond B., Ossent, P., Lutz, H. & Hofmann-Lehmann, R. (2011). Quantification and molecular characterization of the feline leukemia virus A receptor. *Infection, Genetics and Evolution*, doi: 10.1016/j.meegid.2011.08.015.
- Helps, C.R., Lait, P., Damhuis, A., Bjornehammar, U., Bolta, D., Brovida, C., Chabanne, L., Egberink, H., Ferrand, G., Fontbonne, A., Pennisi, M.G., Gruffydd-Jones, T., Gunn-Moore, D., Hartmann, K., Lutz, H., Malandain, E., Mostl, K., Stengel, C., Harbour, D.A. & Graat, E.A. (2005). Factors associated with upper respiratory tract disease caused by feline herpesvirus, feline calicivirus, *Chlamydomydia felis* and *Bordetella bronchiseptica* in cats: experience from 218 European catteries. *The Veterinary Record*, 156:669-73.
- Hennet, P.R., AL Camy, G., McGahie, D.M. & Albouy, M.V. (2011). Comparative efficacy of a recombinant feline interferon omega in refractory cases of calicivirus-positive cats with caudal stomatitis: a randomised, multi-centre, controlled, double-blind study in 39 cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 13, 577-587, doi:10.1016/j.jfms.2011.05.0123.
- Hofmann-Lehmann, R., Tandon, R., Boretti, F.S., Meli, M.L., Willi, B., Cattori, V., Gomes-Keller, M.A., Ossente, P., Golder, M.C., Flynn, J.N. & Lutz, H. (2006). Reassessment of feline leukaemia virus (FeLV) vaccines with novel sensitive molecular assays. *Vaccine*, 24(8), 1087–94.

- Hofmann-Lehmann, R., Cattori, V., Tandon, R., Boretto, F.S., Meli, M.L., Riond, B., Pepin A.C., Willi, B., Ossent, P., & Lutz, H. (2007). Vaccination against the feline leukaemia virus: outcome and response categories and long-term follow-up. *Vaccine*, 25, 5531-5539.
- Hoover, E.A., Zeidner, N.S. & Mullins, J.I. (1990). Therapy of pre-symptomatic FeLV-induced immunodeficiency syndrome with AZT in combination with alpha interferon. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 616, 258–269.
- Hosie, M.J., Addie, D., Bélak, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hartmann, K., Lloret, A., Lutz, H., Marsilio, F., Pennisi, M.G., Radford, A., Thiry, E., Truyen, U. & Horzinek, M. (2009). Feline immunodeficiency. ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 11(7), 575-584. doi:10.1016/j.jfms.2009.05.006.
- Inada, G., Miyazawa, T., Inoshima, Y., Kohmoto, M., Ikeda, Y., Liu, C.H., Lin, J.A., Kou, T.F. & Mikami, T. (1997). Phylogenetic analysis of feline immunodeficiency virus isolated from cats in Taiwan. *Archives of Virology*, 142, 1459-1467.
- Jarrett, W.F., Crawford, E.M., Martin, W.B. & Davie, F. (1964). A Virus-Like Particle Associated with Leukemia (Lymphosarcoma). *Nature*, 202, 567-9.
- Kakinuma, S., Motokawa, K., Hohdatsu, T., Yamamoto, J.K., Koyama, H. & Hashimoto, H. (1995). Nucleotide sequence of feline immunodeficiency virus: classification of Japanese isolates into two subtypes which are distinct from non-japanese subtypes. *Journal Virology*, 69, 3639-3646.
- Kirpensteijn, J. (2006). Feline injection site-associated sarcoma: is it a reason to critically evaluate our vaccination policies?. *Veterinary Microbiology*, 117(1), 59–65.
- Kohmoto, M., Ikeda, Y., Sato, E., Nishimura, Y., Inoshima, Y., Shimojima, M., Tohya, Y., Mikami, T., & Miyazawa, T. (2003). Experimental mucosal infection with molecularly cloned feline immunodeficiency viruses. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 10(1), 185-188.
- Kusuhara, H., Hohdatsu, T., Okumura, M., Sato, K., Suzuki, Y., Motokawa, K., Gemma, T., Watanabe, R., Huang, C., Arai, S., & Koyama, H. (2005). Dual-subtype vaccine (Fel-O-Vax FIV) protects cats against contact challenge with heterologous subtype B FIV infected cats. *Veterinary Microbiology*, 108, 155-165.
- Langhammer, S., Fiebig, U., Kurth, R., & Denner, J. (2005). Neutralising antibodies against the transmembrane protein of feline leukaemia virus (FeLV). *Vaccine*, 23, 3341-3348.
- Lanore, D. (2004). Clinical case 1: management of symptomatic retrovirus infections in a female cat using a treatment with feline omega interferon. In K. de Mari (Ed.), *Veterinary Interferon Handbook*. (pp.59-63). UK: Virbac, S.A.
- Lehman, T.L., O'Halloran, K.P., Fallon, S.A., Habermann, L.M., Campbell, J.A., Nordone, S., Dean, G.A., Hoover, E.A. & Avery, P.R. (2009). Altered bone marrow dendritic cell cytokine production to toll-like receptor and CD40 ligation during chronic feline immunodeficiency virus infection. *Immunology*, 126, 405–412.

- Levy, J.K., Crawford, P.C., Hartmann, K., Hofmann-Lehmann, R., Little, S., Sundahl, E. & Thayer, V. (2008). 2008 American Association of Feline Practitioners' feline retrovirus management guidelines. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, doi:10.1016/j.jfms.2008.03.002, 300-316.
- Levy, J.K., Crawford, P.C., & Slater, M.R. (2004). Effect of vaccination against feline immunodeficiency virus on results of serologic testing in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 225, 1558-1561.
- Linenberger, M.L. & Abkowitz, J.L. (1995). Haematological disorders associated with feline retrovirus infections. *Baillieres Clinical Haematology*, 8, 73-112.
- Liu, W.T., Good, R.A., Trang, L.Q., Engelman, R.W., & Day, N.K. (1984). Remission of leukemia and loss of feline leukemia virus in cats injected with Staphylococcus protein A: association with increased circulating interferon and complement-dependent cytotoxic antibody. *Immunology*, 81, 6471-6475.
- Lutz, H., Addie, D., Bélak, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hartmann, K., Hosie, M.J., Lloret, A., Marsilio, F., Pennisi, M.G., Radford, A., Thiry, E., Truyen, U. & Horzinek, M. (2009). Feline Leukaemia . ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 11, 565-574. doi:10.1016/j.jfms.2009.05.005
- McCaw, D.L., Boon, G.D., Jergens, A.E., Kern, M.R., Bowles, M.H. & Johnson, J.C. (2001). Immunomodulation therapy for feline leukemia virus infection. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 37:356-63.
- Mendoza, R., Anderson, M.M. & Overbaugh, J. (2006). A putative thiamine transport protein is a receptor for feline leukemia virus subgroup A. *Journal Virology*, 80(7), 3378-85.
- Mihaljevic, S.Y. (2003). First clinical experiences with omega-Interferon in the treatment of chronic gingivitis-stomatitis-oropharyngitis of cats. *Der Praktische Tierarzt*, 84, 350-361.
- Miró, G., Doménech, A., Escolar, E., Collado, V.M., Tejerizo, G., De Las Heras, A., & Góme-Lucía, E. (2007). Plasma electrophoretogram in feline immunodeficiency virus (FIV) and/or feline leukaemia virus (FeLV) infections. *Journal of Veterinary Medicine*, 54, 203-209.
- Mogensen, K.E., Lewerenz, M., Reboul, J., Lutfalla, G. & Uzé, G. (1999). The type I interferon receptor: structure, function, and evolution of a family business. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 19, 1069-1098.
- Müller, D. (2002). Interferon therapy in dogs and cats. *Kleintiermedizin*, 8, 334-337
- Nakata, R., Miyazawa, T., Shin, Y.S., Watanabe, R., Mikami, T., & Matsuura, Y. (2003). Reevaluation of host ranges of feline leukemia virus subgroups. *Microbes and Infection*, 5, 947-950.

- Nelson, R., & Couto, C. (2006). Small Animal Internal Medicine. In R. Nelson, & C. Couto, *Small Animal Internal Medicine* (3 rd ed., pp. 37, 542-545). Elsevier - Health Sciences Division.
- Ninomiya, H., Fukutome, A., Kabayashi, K., Shin, Y., Uchino, T. & Motoyoshi, S. (1999). Effect of recombinant feline interferon on feline calicivirus infection. Proceedings of the XVI World Congress World Small Animal Veterinary Association (WSAVA) and VI. *National Congress Vereinigung Österreichischer Kleintier-praktiker (VÖK), Vienna-1999*.
- Ninomiya H., Fukutome, A., Kabayashi, K., Shin, Y., Uchino, T. & Motoyoshi, S. (1999). Effect of recombinant feline interferon on feline calicivirus infection. Proceedings of the XVI World Congress World Small Animal Veterinary Association (WSAVA) and VI. *National Congress Vereinigung Österreichischer Kleintier-praktiker (VÖK), Vienna-1999*.
- Nishimura, Y., Goto, Y., Pang, H., Endo, Y., Mizuno, T., Momoi, Y., Watari, T., Tsujimoto, H. & Hasegawa, A. (1998). Genetic heterogeneity of *env* gene of feline immunodeficiency virus obtained from multiple districts in Japan. *Virus Research*, 57, 101-112.
- Pan, J., Zhong, C., Chang, Z. & Roy-Burman, P. (2003). A potencial therapeutic strategy to combat leukemia virus infection. *Cancer Biology & Therapy*, 2 (1), 92-99.
- Pecoraro, M.R., Tomonaga, K., Miyazawa, T., Kawaguchi, Y., Sugita, S., Tohya, Y., Kai, C., Etcheverrigaray, M.E. & Mikami, T. (1996). Genetic diversity of Argentina isolates of feline immunodeficiency virus. *Journal of General Virology*, 77:2031-2035.
- Pedersen, N., Ho E., Brown, M. & Yamamoto, J. (1987). Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency like syndrome. *Science*, 235, 790–793.
- Pedersen, N.C., Satop, R., Foley, J.E. & Poland, A.M. (2004). Common virus infections in cats, before and after being placed in shelters, with emphasis on Feline enteric coronavirus. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 6:83-88.
- Pedretti, E., Passeri, B., Amadori, M., Isola, P., Di Pede, P., Telera, A., Vescovini, R., Quintavalla, F. & Pistillo, M. (2006). Low-dose interferon-alpha treatment for feline immunodeficiency virus infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 109, 245–254.
- Pinches, M.D., Diesel, G., Helps, C.R., Tasker, S., Egan, K. & Gruffydd-Jones, T.J. (2007). An update on FIV and FeLV test performance using a Bayesian statistical approach. *Veterinary Clinical Pathology*, 36(2), 141-147.
- Pepin, A.C., Tandon, R., Cattori, V., Niederer, E., Riond, B., Willi, B., Lutz, H., & Hofmann-Lehmann, R. (2007). Cellular segregation of feline leukemia provirus and viral RNA in leukocyte subsets of long-term experimentally infected cats. *Virus Research*, 127, 9- 16.
- Pestka, S., Krause, C.D. & Walter, M.R. (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunology Review*, 202, 8-32.

- Pistello, M., Cammarota, G., Nicoletti, E., Matteucci, D., Curcio, M., Mauro, D.D. & Bendinelli, M. (1997). Analysis of the genetic diversity and phylogenetic relationship of the Italian isolates of feline immunodeficiency virus indicates a high prevalence and heterogeneity of subtype B. *Journal of General Virology*, 78, 2247-2257.
- Quigley, J.G., Burns, C.C., Anderson, M.M., Lynch E.D., Sabo, K.M., Overbaugh, J. & Abkowitz, J.L. (2000). Cloning of the cellular receptor for feline leukemia virus subgroup C (FeLV-C), a retrovirus that induces red cell aplasia. *Blood*, 95(3), 1093–9.
- Radford, A. (2006). Fe-Feline Medicine, Antiviral therapy in cats- what works and what doesn't. *World Congress WSAVA/FECAA/CSAVA*.
- Ravi, M., Wobeser, G.A., Taylor, S. M. & Jackson, M. L. (2010). Naturally acquired feline immunodeficiency virus (FIV) infection in cats from western Canada: Prevalence, disease associations, and survival analysis. *Canadian Veterinary Journal*, 51, 271–276.
- Radford, A., Addie, D., Bélak, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hartmann, K., Hosie, M.J., Lloret, A., Lutz, H., Marsilio, F., Pennisi, M.G., Thiry, E., Truyen, U. & Horzinek, D. (2009). Feline Calicivirus Infection. ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 11(7), 575-584. doi:10.1016/j.jfms.2009.05.006.
- Richardson, J., Pancino, G., Merat, R., Leste-Lasserre, T., Moraillon, A., Schneider-Mergener, J., Alizon, M., Sonigo, P. & Heveker, N. (1999). Shared usage of the chemokine receptor CXCR4 by primary and laboratory-adapted strains of feline immunodeficiency virus. *Journal Virology*, 73:3661-3671.
- Riondato, F., Gianella, P., Guglielmino, R., Cagnasso, A. & Bo, S. (2003). Effects of interferon alpha (INF-alpha) therapy on per-ipheral blood lymphocyte subsets from FIV and FeLV naturally infected cats. *Vet. Res. Commun*, 27, 429–432.
- Rosado, C.R. (2009). *Rastreio Viroológico de carnívoros errantes e caracterização genética viral*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Roy-Burman, P. (1995). Endogenous env elements: partners in generation of pathogenic feline leukemia viruses. *Virus Genes*, 11(2-3), 147-61.
- Taylor, S.S., Tappin, S.W., Dodkin, S.J., Papasouliotis, K., Casamian-Sorrosal, D. & Tasker, S. (2010). Serum protein electrophoresis in 155 cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 12, 643-653, doi:10.1016/j.jfms.2010.03.01.
- Samuel, C.E. (2001). Antiviral Actions of Interferon. *Clinical Microbiology Reviews*, 14.(4), 778-809, Doi: 10.1128/CMR.
- Sandmeyer, L.S., Keller, C.B. & Bienzle, D. (2005). Effects of interferon-alpha on cytopathic changes and titers for feline herpesvirus-1 in primary cultures of feline corneal epithelial cells. *American Journal of Veterinary Research*, 66, 210-216.

- Sellon, R.K. & Hartmann, K. (2006). Feline Immunodeficiency Virus Infection. In *Infectious Diseases of the Dog and Cat , Revised Reprint* (3rd ed., pp. 131-143). St Louis, Missouri: Saunders.
- Sheets, M.A., Unger, B.A., Giggelman, G.E. Jr., & Tizard, I.R. (1991). Studies of the effect of acemannan on retrovirus infections: clinical stabilization of feline leukemia virus-infected cats. *Molecular Biotherapy*, 3(1), 41-45.
- Shelton, G.H., Grant, C.K., Cotter, S.M., Gardner, M.B., Hardy, W.D & DiGiacomo, R.F. (1990). Feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus infections and their relationships to lymphoid malignancies in cats: A retrospective study (1968–1988). *Journal Acquired Immune Deficiency Syndrome*, 3, 623–630.
- Shelton, G.H. & Linenberger, M.L. (1995). Hematologic abnormalities associated with retroviral infections in the cat. *Seminars in Veterinary Medicine & Surgery (Small Animal)*, 10, 220–233.
- Shimojima, M., Miyazawa, T., Ikeda, Y., McMonagle, E.L., Haining, H., Akashi, H., Takeuchi, Y., Hosie, M.J. & Willett, B.J. (2004). Use of CD134 As a Primary Receptor by the Feline Immunodeficiency Virus. *Science*, 303(20), 1192-1195.
- Shirazi, Y. & Pitha, P.M. (1992). A interferon inhibits early stages of the human immunodeficiency virus type 1 replication cycle. *Journal Virology*, 66, 1321-1328.
- Sodora, D.L., Shaper, E.G., Kitchell, B.E., Dow, S.W., Hoover, E.A. & Mullins, J.I. (1994). Identification of three feline immunodeficiency virus (FIV) env gene subtypes and comparison of the FIV and human immunodeficiency virus type 1 evolutionary patterns. *Journal Virology*, 68, 2230-2238.
- Sprague, W.S., Terwee, J.A. & Vandewoude, S. (2010). Temporal association of large granular lymphocytosis, neutropenia, proviral load, and FasL mRNA in cats with acute feline immunodeficiency virus infection. *Veterinary immunology and immunopathology*, 134, 115-121.
- Steinrigl, A. & Klein, D. (2003). Phylogenetic analysis of feline immunodeficiency virus in Central Europe: a prerequisite for vaccination and molecular diagnostics. *Journal Genetics Virology*, 84, 1301-1307.
- Tanabe, T. & Yamamoto, J.K. (2001). Phenotypic and functional characteristics of FIV infection in the bone marrow stroma. *Virology*, 282, 113–122.
- Tandon, R., Cattori, V., Gomes-Keller, M.A., Meli, M.L., Golder, M.C., Lutz, H. & Hofmann-Lehman, R. (2005). Quantitation of feline leukaemia virus viral and proviral loads by TaqMan[®] real-time polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, 130, 124-132.
- Tejerizo, G., Domenech, A., Illera, J.C., Collado, V.M., & Gomez-Lucia, E. (2005). Effect of 17 β -estradiol and progesterone on the expression of FeLV in chronically infected cells. *Veterinary Microbiology*, 109, 191-199.

- Thiry, E., Addie, D., B  lak, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hartmann, K., Hosie, M.J., Lloret, A., Lutz, H., Marsilio, F., Pennisi, M.G., Radford, A., Truyen, U. & Horzinek, M. (2009). Feline Herpesvirus Infection. ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 11, 547-555. doi:10.1016/j.jfms.2009.05.003.
- Torres, A.N., Mathiason, C.K., & Hoover, E.A. (2005). Re-examination of feline leukemia virus: host relationships using real-time PCR. *Virology*, 332, 272-283.
- Verneuil, M. (2004). Traitement de la keratite herpetique feline par l'interferon omega en instillation topique: Etude preliminaire. *Compte Rendu du Congres ECVO-ESVO-DOK Munich – 2004*.
- Weaver, E.A., Collisson, E.W., Slater, M. & Zhu, G. (2004). Phylogenetic analyses of Texas isolates indicate an evolving subtype of the clade B feline immunodeficiency viruses. *Journal Virology*, 78, 2158-2163.
- Willett, B.J., McMonagle, E.L., Logan, N., Spiller, O.B, Schneider, P. & Hosie, M.J. (2007). Probing the interaction between feline immunodeficiency virus and CD134 by using the novel monoclonal antibody 7D6 and the CD134 (Ox40) ligand. *Journal Virology*, 81(18), 9665–79.
- Willett, B.J., Hosie, M.J., Neil, J.C., Turner, J.D. & Hoxie, J.A. (1997). Common mechanism of infection by lentiviruses. *Nature*, 385 (6617), 587.
- Yates, K.M., Rosenberg, L.J., Harris, C.K., Bronstad, D.C., King, G.K., Biehle, G.A., Walker, B., Ford, C.R., Hall, J.E., & Tizard, I.R. (1992). Pilot study of the effect of acemannan in cats infected with feline immunodeficiency virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 35, 177-189.
- Zeidner, N.S., Myles, M.H., Mathiason-DuBard, C.K., Dreitz, M.J., Mullins, J.I. & Hoover, E.A., (1990). Alpha interferon (2b) in combination with zidovudine for the treatment of presymptomatic feline leukemia virus-induced immunodeficiency syndrome. *Antimicrob Agents Chemother*, 34, 1749–1756.

ANEXOS

Anexo 1: Exames clínicos dos gatos FIV⁺ realizados durante o tratamento.

	Gato 1	Gato 2	Gato 3	Gato 4	Gato 5	Gato 6	Gato 7
AVALIAÇÃO CLÍNICA Dia 0							
Úlceras Orais/Gengivite	2	2	2	2	1	2	1
Granulomas Orais	2	0	0	1	2	1	0
Conjuntivite (uni/bilateral)	2	0	0	0	0	0	0
Linfadenomegália	1	0	0	0	0	0	0
Corrimento ocular	1	0	0	0	0	0	0
Corrimento nasal	2	0	0	0	0	0	0
Mucosas pálidas	0	0	0	0	0	0	0
Pêlo seco/seborreia	1	0	0	0	0	0	0
Condição corporal	2	0	0	0	2	1	0
Consistência fecal	0	0	0	0	1	0	0
Palpação abdominal	0	0	0	0	0	0	0
Co-morbilidade	0	0	0	0	1	1	0
TOTAL	13	2	2	3	7	5	1
AVALIAÇÃO CLÍNICA Dia 10							
Úlceras Orais/Gengivites	2	2	2	2	1	2	1
Granulomas Orais	1	0	0	1	2	1	0
Conjuntivite (uni/bilateral)	0	0	0	0	0	0	0
Linfadenomegália	1	0	0	0	0	0	0
Corrimento ocular	1	0	0	0	0	0	0
Corrimento nasal	1	0	0	0	0	0	0
Mucosas pálidas	0	0	0	0	0	0	0
Pêlo seco/seborreia	1	0	0	0	0	0	0
Condição corporal	2	0	0	0	2	1	0
Consistência fecal	0	0	0	0	1	0	0
Palpação abdominal	0	0	0	0	0	0	0
Co-morbilidade	1	0	0	0	1	1	0
TOTAL	10	2	2	3	7	5	1
AVALIAÇÃO CLÍNICA Dia 30							
Úlceras Orais/gengivite	2	1	2	1	1	1	1
Granulomas Orais	1	0	0	1	2	1	0
Conjuntivite (uni/bilateral)	0	0	0	0	0	0	0
Linfadenomegália	0	0	0	0	0	0	0
Corrimento ocular	1	0	0	0	0	0	0
Corrimento nasal	1	0	0	0	0	0	0
Mucosas pálidas	0	0	0	0	0	0	0
Pêlo seco/seborreia	1	0	0	0	0	0	0
Condição corporal	1	0	0	0	1	1	0
Consistência fecal	0	0	0	0	0	0	0
Palpação abdominal	0	0	0	0	0	0	0
Co-morbilidade	1	0	0	0	1	1	0
TOTAL	8	1	2	2	5	4	1
AVALIAÇÃO CLÍNICA Dia 65							
Úlceras Orais/gengivite	1	0	2	1	1	0	1
Granulomas Orais	1	0	0	1	0	0	0
Conjuntivite (uni/bilateral)	0	0	0	0	0	0	0
Linfadenomegália	0	0	0	0	0	0	0
Corrimento ocular	1	0	0	0	0	0	0
Corrimento nasal	1	0	0	0	0	0	0
Mucosas pálidas	0	0	0	0	0	0	0
Pêlo seco/seborreia	1	0	0	0	0	0	0
Condição corporal	1	0	0	0	0	1	0
Consistência fecal	0	0	0	0	0	0	0
Palpação abdominal	0	0	0	0	0	0	0
Co-morbilidade	0	0	0	0	1	1	0
TOTAL	6	0	2	2	2	2	1

Anexo 2: Exames clínicos dos gatos FeLV⁺ e FIV/FeLV⁺ realizados durante o tratamento.

	Gato8	Gato9	Gato10	Gato11	Gato12	Gato 13	Gato 14	Gato15	Gato 16
AVALIAÇÃO CLÍNICA Dia 0									
Úlceras Orais/Gengivite	2	0	2	1	2	2	2	0	2
Granulomas Orais	0	0	2	0	0	0	0	0	2
Conjuntivite (uni/bilateral)	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Linfadenomegália	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Corrimento ocular	0	0	1	0	0	1	0	0	0
Corrimento nasal	0	1	1	0	0	2	0	0	0
Mucosas pálidas	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Pêlo seco/seborreia	0	0	0	0	0	1	0	0	1
Condição corporal	0	2	0	0	0	1	0	1	0
Consistência fecal	0	0	0	0	1	0	0	0	1
Palpação abdominal	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Co-morbilidade	0	2	0	1	0	2	0	0	1
TOTAL	2	5	6	2	3	11	0	1	7
AVALIAÇÃO CLÍNICA Dia 10									
Úlceras Orais/Gengivites	2	0	2	1	2	2	2	0	2
Granulomas Orais	0	0	2	0	0	0	0	0	2
Conjuntivite (uni/bilateral)	0	0	0	0	2	1	0	0	0
Linfadenomegália	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Corrimento ocular	0	0	0	0	2	0	0	0	0
Corrimento nasal	0	1	1	0	2	2	0	0	0
Mucosas pálidas	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Pêlo seco/seborreia	0	0	0	0	1	1	0	0	1
Condição corporal	0	0	0	0	2	0	0	1	0
Consistência fecal	0	0	0	0	1	0	0	0	1
Palpação abdominal	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Co-morbilidade	0	1	0	1	0	2	0	0	1
TOTAL	2	2	5	2	14	8	2	1	7
AVALIAÇÃO CLÍNICA Dia 30									
Úlceras Orais/gengivite	2	0	1	1	2	2	2	0	1
Granulomas Orais	0	0	2	0	0	0	0	0	1
Conjuntivite (uni/bilateral)	0	0	2	0	0	1	0	0	0
Linfadenomegália	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Corrimento ocular	1	1	1	0	1	0	0	0	0
Corrimento nasal	1	1	1	0	1	2	0	0	0
Mucosas pálidas	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Pêlo seco/seborreia	0	0	1	0	1	1	0	0	1
Condição corporal	1	0	2	0	2	0	0	1	0
Consistência fecal	0	0	0	0	1	0	0	0	1
Palpação abdominal	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Co-morbilidade	0	1	1	1	0	2	0	0	1
TOTAL	5	3	11	2	9	8	2	1	5
AVALIAÇÃO CLÍNICA Dia 65									
Úlceras Orais/gengivite	1	H	1	1	0	2	0	0	1
Granulomas Orais	0	H	1	0	0	0	0	0	1
Conjuntivite (uni/bilateral)	0	H	0	0	1	1	0	0	0
Linfadenomegália	0	H	0	0	0	0	0	0	0
Corrimento ocular	0	H	0	0	0	0	0	0	0
Corrimento nasal	0	H	0	0	0	0	0	0	0
Mucosas pálidas	0	H	0	0	0	0	0	0	0
Pêlo seco/seborreia	0	H	0	0	0	0	0	0	0
Condição corporal	1	H	1	0	1	0	0	1	0
Consistência fecal	0	H	0	0	1	0	0	0	0
Palpação abdominal	0	H	0	0	0	0	0	0	0
Co-morbilidade	0	H	1	0	0	2	0	0	1
TOTAL	2		4	1	3	5	0	1	3

Anexo 3: Hemogramas dos gatos FIV⁺ realizados durante o tratamento.

	Gato 1	Gato 2	Gato 3	Gato 4	Gato 5	Gato 6	Gato 7
Dia 0							
Eritrócitos [$5 - 10 \times 10^6/\mu\text{l}$]	7,57	5,93	9,91	7	9,68	8,74	9,43
Hematócrito [24 – 45 %]	32,2	29,2	41,8	27,3	38,5	39	37,4
Leucócitos [$5,5 - 19,5 \times 10^3/\mu\text{l}$]	11	8,01	8,96	24,4	8,19	10,7	9,88
Neutrófilos [2500 – 12500]	8470	5050	5020	19770	6040	6420	7210
Linfócitos [1500- 7000]	1540	2480	3410	3660	3310	3530	1880
Monocitos [0 – 850]	440	400	180	980	0	430	690
Dia 10							
Eritrócitos [$5 - 10 \times 10^6/\mu\text{l}$]	5,01	6,03	7,04	5,94	8,17	7,94	9,6
Hematócrito [24 – 45 %]	20,4	25	29,8	22,5	34,2	32	36,9
Leucócitos [$5,5 - 19,5 \times 10^3/\mu\text{l}$]	9,58	9,36	5,62	17,3	9,35	9,48	11,9
Neutrófilos [2500 – 12500]	6040	5900	4050	14710	5700	5024	9640
Linfócitos [1500- 7000]	2970	2900	1180	1560	3090	3890	1790
Monocitos [0 – 850]	480	560	280	870	370	380	357
Dia 30							
Eritrócitos [$5 - 10 \times 10^6/\mu\text{l}$]	6,49	6,53	7	5,76	7,26	12,5	9,27
Hematócrito [24 – 45 %]	29,7	29,7	31,1	21,7	27,4	46,4	32,9
Leucócitos [$5,5 - 19,5 \times 10^3/\mu\text{l}$]	11,2	11,4	7,43	20,9	9,46	8,55	9,9
Neutrófilos [2500 – 12500]	9072	8322	4680	14630	5108	4617	7029
Linfócitos [1500- 7000]	1680	2280	2303	45598	3879	3677	2277
Monocitos [0 – 850]	112	342	372	1045	378	257	396
Dia 65							
Eritrócitos [$5 - 10 \times 10^6/\mu\text{l}$]	9,64	7,56	7,85	6,82	4,21	9,9	6,67
Hematócrito [24 – 45 %]	34,2	31,9	36	30,4	20,7	36,1	30,6
Leucócitos [$5,5 - 19,5 \times 10^3/\mu\text{l}$]	12	12,3	9,29	12,3	12,6	9,9	16,9
Neutrófilos [2500 – 12500]	9960	667,89	4645	8733	9198	5049	13520
Linfócitos [1500- 7000]	1320	520,29	3808,9	3321	2646	4356	2028
Monocitos [0 – 850]	120	27,06	743,2	246	504	297	1183

Anexo 4: Hemogramas dos gatos FeLV⁺ e FIV/FeLV⁺ realizados durante o tratamento.

	Gato8	Gato9	Gato10	Gato11	Gato12	Gato13	Gato14	Gato 15	Gato16
Dia 0									
Eritrócitos [5 – 10 ×10 ⁶ /μl]	7,25	9,13	6,62	8,41	5,86	7,85	12,6	10,1	8,45
Hematócrito [24 – 45 %]	31,3	39,8	30,8	36,2	29,2	33	51,4	38	32,1
Leucócitos [5,5 – 19,5 ×10 ³ /μl]	6,31	6,35	11,2	9,74	7,01	10,8	11	12,7	16,8
Neutrófilos [2500 – 12500]	4100	4570	6380	7110	4350	7580	7590	6860	10750
Linfócitos [1500- 7000]	1770	1330	4260	1950	2170	2268	2090	3940	4540
Monocitos [0 – 850]	1130	1130	220	97	210	320	660	1020	340
Dia 10									
Eritrócitos [5 – 10 ×10 ⁶ /μl]	6,03	5,27	7,02	8,01	3,24	7,57	8,87	7,14	6,62
Hematócrito [24 – 45 %]	24	23,9	29,7	31,9	16,8	31,6	37,3	26,4	28,3
Leucócitos [5,5 – 19,5 ×10 ³ /μl]	9,88	5,72	7,4	9,71	4,24	17,9	15,1	7,48	18,9
Neutrófilos [2500 – 12500]	7110	3490	3770	6990	3390	15570	12680	4640	15690
Linfócitos [1500- 7000]	2070	1890	3260	1460	640	1970	1810	2540	2840
Monocitos [0 – 850]	690	320	370	970	80	358	450	75	380
Dia 30									
Eritrócitos [5 – 10 ×10 ⁶ /μl]	6,06	5,29	8,51	8,87	7,3	8,46	8,76	6,75	5,52
Hematócrito [24 – 45 %]	27,1	24,4	31,7	37,3	35,9	31,7	37	31	22
Leucócitos [5,5 – 19,5 ×10 ³ /μl]	21	14,5	8,86	17,9	10,7	13,2	10,1	8,44	16,3
Neutrófilos [2500 – 12500]	18270	10585	7353	14320	8667	10956	6363	7005	11899
Linfócitos [1500- 7000]	1890	3045	9638	2506	1605	1584	3434	1013	3423
Monocitos [0 – 850]	840	580	88,6	895	107	132	101	844	652
Dia 65									
Eritrócitos [5 – 10 ×10 ⁶ /μl]	9,32	8,21	3,16	5,89	6,92	4,9	7,47	7,53	10,2
Hematócrito [24 – 45 %]	36,5	33,9	17,8	20,6	31,8	20,2	33,1	28,2	44,2
Leucócitos [5,5 – 19,5 ×10 ³ /μl]	23,8	12,4	3,19	21,1	12	5,07	8,11	10,5	9,28
Neutrófilos [2500 – 12500]	21658	8680	1595	14137	9960	3599,7	4866	4593,3	5939,2
Linfócitos [1500- 7000]	1666	2728	1435,5	4431	1320	1166,1	1703,1	3465	2876,8
Monocitos [0 – 850]	476	620	159,5	210	120	253,5	567,7	210	92,8

Anexo 5: Proteinogramas dos gatos FIV⁺ realizados durante o tratamento.

Albumina (Valores de referência: 2,1-4,0 g/dL)							
	Gato 1	Gato 2	Gato 3	Gato 4	Gato 5	Gato 6	Gato 7
Dia 0	3,3	3,6	3,3	3	3,6	3	3,2
Dia 10	5,1	5	4,4	3,5	3,3	2,8	4,7
Dia 30	4,6	4,7	4,4	4,3	3,4	5,1	2,9
Dia 65	3,2	4,6	4,3	2,8	2,9	2,5	3,4
Alfa 1 (Valores de referência: 0,2-1,1 g/dL)							
Dia 0	0	0	0,1	0,1	0	0,1	0
Dia 10	0,1	0,1	0,3	0,3	0,1	0,2	0,1
Dia 30	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2	0,2	0
Dia 65	0,9	0,3	0,3	0,2	0,1	0	0,1
Alfa 2 (Valores de referência: 0,4-0,9 g/dL)							
Dia 0	1,6	1,5	1,7	2,1	1,6	3,5	1,7
Dia 10	2,7	2,6	1,7	2,3	2	3,1	2,9
Dia 30	2,4	2,6	2	2,8	2,3	3	1,7
Dia 65	2,4	2,3	2,5	2,2	1,8	2,4	0,8
Beta (Valores de referência: 0,9-1,9 g/dL)							
Dia 0	1,1	0,8	0,6	0,5	0,4	1,7	0,6
Dia 10	1,7	0,9	0,7	0,9	0,7	1,1	0,9
Dia 30	2,2	1,4	0,7	1,3	0,8	0,9	1
Dia 65	0,6	1,3	1,3	0,5	0,4	0,4	1,4
Proteína-C Reactiva (Valores de referência: 90-160 g/dL)							
Dia 0	101,1	83,6	94	159	64,2	198,8	115,3
Dia 10	218,6	122,7	96,8	188,5	112,5	198,6	218,6
Dia 30	174,8	215,8	119,4	244	184,3	255,6	258
Dia 65	160,6	174	202,2	260,9	198,3	277	234,8
Gama (Valores de referência: 1,3-2,2 g/dL)							
Dia 0	3	2	2,8	3,9	2	3,3	2,7
Dia 10	4,4	3,9	3,4	3,8	2,3	2,8	4,3
Dia 30	4,5	3	3,8	4,8	2,3	2,4	2,4
Dia 65	3,3	3,5	3,2	4,3	2	2,3	2,7
Racio Albumina/Globulina (Valores de referência: 0,45-1,3 g/dL)							
Dia 0	0,57	0,85	0,66	0,44	0,86	0,35	0,62
Dia 10	0,57	0,65	0,75	0,45	0,64	0,39	0,57
Dia 30	0,49	0,64	0,66	0,47	0,59	0,8	0,57
Dia 65	0,45	0,62	0,62	0,39	0,66	0,47	0,69
Proteínas Totais (Valores de referência: 5,7-7,9 g/dL)							
Dia 0	9	7,9	8,5	9,6	7,6	11,6	8,2
Dia 10	14	12,5	10,5	10,8	8,4	10	12,9
Dia 30	14	12	11,2	13,5	9	11,6	8
Dia 65	10,4	12	11,6	10	7,2	7,6	8,4

Anexo 6: Proteinogramas dos gatos FeLV⁺ e FIV/FeLV⁺ realizados durante o tratamento.

Albumina (Valores de referência: 2,1-4,0)									
	Gato 8	Gato 9	Gato10	Gato11	Gato12	Gato13	Gato14	Gato15	Gato16
Dia 0	3,5	4,5	3,3	2,3	4	3,7	4,8	4,8	3,6
Dia10	4,3	3,3	4,6	4,7	5	4,2	4,6	4,9	4,8
Dia 30	1,8	3,2	1,1	3	2,8	4,3	3,1	4,7	5,7
Dia 65	1,6	2,7	2,2	2,8	2,8	2,7	2,5	2,7	3,6
Alfa 1 (Valores de referência: 0,2-1,1)									
Dia 0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2
Dia 10	0,3	0,1	0,2	0,6	0,3	0,3	0,1	0,4	0,2
Dia 30	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0	0,4	0,5
Dia 65	0,1	0,1	0	0,1	0,1	0,4	0	0,1	0,2
Alfa 2 (Valores de referência: 0,4-0,9)									
Dia 0	2,2	2,1	1,4	1,4	1,5	2,2	2,5	2,5	1,5
Dia 10	2,8	2,4	2	2	2,3	3,3	2,4	2,9	3
Dia 30	1,6	0,7	0,5	1,7	3	2,1	2	2,8	3
Dia 65	1,7	1,4	1,7	1,5	1,3	1,6	1,6	1,8	2
Beta (Valores de referência: 0,9-1,9)									
Dia 0	0,4	0,7	0,5	0,9	0,8	0,7	0,8	1,3	0,9
Dia 10	0,9	0,9	0,9	1	0,8	1,3	0,9	0,9	1,2
Dia 30	0,5	1,5	0,2	0,6	1,1	0,5	0,65	1,3	0,8
Dia 65	0,3	0,6	0,3	0,4	0,4	0,5	0,3	0,8	1
Proteína-C Reactiva (Valores de referência: 90-160)									
Dia 0	156,7	136,5	138,8	232,5	181,7	175,5	210	158,3	121,9
Dia 10	211,3	199,4	210,8	142,9	150,8	153,7	219,9	132,9	213,2
Dia 30	247,7	301,4	267,2	293,4	226,5	229,6	330	184,6	191,8
Dia 65	229,3	254	312,1	261,9	282,3	305,9	321,2	264	359,9
Gama (Valores de referência: 1,3-2,2)									
Dia 0	3	1,4	2,2	1,7	1,9	2,9	4,2	3,3	2,2
Dia 10	3,3	1,3	3,5	2,7	2,4	4,4	2,8	3,9	2,8
Dia 30	1,6	1,2	1,1	1,8	2,6	2,1	1,9	3,6	2,6
Dia 65	1,9	0,8	2,6	1,6	1,8	2,4	2	2,2	1,2
Racio Albumina/Globulina (Valores de referência: 0,45-1,3)									
Dia 0	0,65	1,07	0,81	0,59	0,88	0,62	0,62	0,64	0,78
Dia 10	0,6	0,72	0,69	0,75	0,85	0,44	0,74	0,63	0,67
Dia 30	0,52	0,9	0,58	0,69	0,42	0,9	0,65	0,59	0,83
Dia 65	0,4	0,97	0,46	0,77	0,84	0,56	0,6	0,57	0,83
Proteínas Totais (Valores de referência: 5,7-7,9)									
Dia 0	9,2	8,8	7,5	6,4	8,4	9,6	12,5	12	8,4
Dia 10	11,6	8	11,2	11	10,8	13,5	10,8	13	12
Dia 30	5,6	6,8	8,4	7,2	9,6	9,2	7,6	12,8	12,6
Dia 65	5,6	5,6	6,8	6,4	6,4	7,6	6,4	7,6	8

Anexo 7: Resultados do teste estatístico de Wilcoxon para amostras emparelhadas para avaliação da existência de diferenças estatisticamente significativas nos parâmetros do proteinograma nos 3 grupos de gatos (FIV⁺, FeLV⁺ e FIV/FeLV⁺).

	G.alfa1.D65 - G.alfa1.D0	Alb.D65 - Alb.D0	G.alfa2.D65 - G.alfa2.D0	G.Beta.D6 5 - G.Beta.D0	G.Gama.D65 - G.Gama.D0	CRP.D65 - CRP.D0	RelA.G.D6 5 - RelA.G.D0	Pts.D65 - PTs.D0
Z	-1,980 ^a	-,254 ^a	-,170 ^a	-,271 ^a	-,948 ^a	-2,366 ^a	-1,101 ^b	-,931 ^a
Asymp. Sig. (2- tailed)	,048	,799	,865	,786	,343	,018	,271	,352

a. Based on negative ranks.

b. Based on positive ranks.

c. Infecção = FIV

d. Wilcoxon Signed Ranks Test

	G.alfa1.D6 5 - G.alfa1.D0	Alb.D65 - Alb.D0	G.alfa2.D6 5 - G.alfa2.D0	G.Beta.D6 5 - G.Beta.D0	G.Gama.D65 - G.Gama.D0	CRP.D65 - CRP.D0	RelA.G.D6 5 - RelA.G.D0	Pts.D65 - PTs.D0
Z	,000 ^a	-1,992 ^b	-1,363 ^b	-2,214 ^b	-1,577 ^b	-2,201 ^c	-1,363 ^b	-2,032 ^b
Asymp. Sig. (2- tailed)	1,000	,046	,173	,027	,115	,028	,173	,042

a. The sum of negative ranks equals the sum of positive ranks.

b. Based on positive ranks.

c. Based on negative ranks.

d. Infecção = FeLV

e. Wilcoxon Signed Ranks Test

	G.alfa1.D6 5 - G.alfa1.D0	Alb.D65 - Alb.D0	G.alfa2.D65 - G.alfa2.D0	G.Beta.D6 5 - G.Beta.D0	G.Gama.D65 - G.Gama.D0	CRP.D65 - CRP.D0	RelA.G.D6 5 - RelA.G.D0	Pts.D65 - PTs.D0
Z	-1,000 ^a	-1,342 ^a	-1,069 ^a	-1,089 ^a	-1,604 ^a	-1,604 ^b	-,535 ^a	-1,604 ^a
Asymp. Sig. (2- tailed)	,317	,180	,285	,276	,109	,109	,593	,109

a. Based on positive ranks.

b. Based on negative ranks.

c. Infecção = FIV/FeLV

d. Wilcoxon Signed Ranks Test

Anexo 8: Resultados do teste estatístico de Wilcoxon para amostras emparelhadas para avaliação da existência de diferenças estatisticamente significativas nos parâmetros do hemograma nos 3 grupos de gatos (FIV⁺, FeLV⁺ e FIV/FeLV⁺).

	Eritrócitos.D65 - Eritrócitos.D0	Hematócrito.D65 - Hematócrito.D0	Leucócitos.D6 5 - Leucócitos.D0	Linfócitos.D6 5 - Linfócitos.D0	Neutrófilos.D6 5 - Neutrófilos.D0	Monócitos.D65 - Monócitos.D0
Z	-,676 ^a	-1,183 ^a	-1,014 ^b	-,507 ^a	-,169 ^a	-,169 ^b
Asymp. Sig. (2- tailed)	,499	,237	,310	,612	,866	,866

a. Based on positive ranks.

b. Based on negative ranks.

c. Infecção = FIV

d. Wilcoxon Signed Ranks Test

	Eritrócitos.D65 - Eritrócitos.D0	Hematócrito.D65 - Hematócrito.D0	Leucócitos.D6 5 - Leucócitos.D0	Linfócitos.D6 5 - Linfócitos.D0	Neutrófilos.D6 5 - Neutrófilos.D0	Monócitos.D65 - Monócitos.D0
Z	-1,153 ^a	-1,572 ^a	-,943 ^b	-,314 ^a	-1,363 ^b	-2,201 ^a
Asymp. Sig. (2- tailed)	,249	,116	,345	,753	,173	,028

a. Based on positive ranks.

b. Based on negative ranks.

c. Infecção = FeLV

d. Wilcoxon Signed Ranks Test

	Eritrócitos.D65 - Eritrócitos.D0	Hematócrito.D65 - Hematócrito.D0	Leucócitos.D65 - Leucócitos.D0	Linfócitos.D6 5 - Linfócitos.D0	Neutrófilos.D6 5 - Neutrófilos.D0	Monócitos.D65 - Monócitos.D0
Z	-1,069 ^a	-,535 ^a	-1,604 ^a	-1,604 ^a	-1,604 ^a	-1,604 ^a
Asymp. Sig. (2- tailed)	,285	,593	,109	,109	,109	,109

a. Based on positive ranks.

b. Infecção = FIV/FeLV

c. Wilcoxon Signed Ranks Test

Anexo 9: Resultados do teste estatístico de Wilcoxon para amostras emparelhadas para avaliação da existência de diferenças estatisticamente significativas nos exames clínico nos 3 grupos de gatos (FIV⁺, FeLV⁺ e FIV/FeLV⁺).

Test Statistics^{b,c}

	Ex.Clinico.D65 - Ex.Clinico.D0
Z	-2,023 ^a
Asymp. Sig. (2-tailed)	,043

a. Based on positive ranks.

b. Infecção = FIV

c. Wilcoxon Signed Ranks Test

Test Statistics^{b,c}

	Ex.Clinico.D65 - Ex.Clinico.D0
Z	-1,826 ^a
Asymp. Sig. (2-tailed)	,068

a. Based on positive ranks.

b. Infecção = FeLV

c. Wilcoxon Signed Ranks Test

Test Statistics^{b,c}

	Ex.Clinico.D65 - Ex.Clinico.D0
Z	-,447 ^a
Asymp. Sig. (2-tailed)	,655

a. Based on negative ranks.

b. Infecção = FIV/FeLV

c. Wilcoxon Signed Ranks Test

Anexo 10: Resultados do teste estatístico de Kruskal-Wallis com comparação múltipla das médias das ordens para avaliação da existência de diferenças estatisticamente significativas nos parâmetros do proteinograma entre os 3 grupos de gatos (FIV⁺, FeLV⁺ e FIV/FeLV⁺).

Test Statistics^{a,b}

	G.alfa1.D0	Alb.D0	G.alfa2.D0	G.Beta.D0	G.Gama.D0	RelA.G.D0	PTs.D0
Chi-Square	8,053	5,842	1,385	2,763	4,036	1,598	2,778
Df	2	2	2	2	2	2	2
Asymp. Sig.	,018	,054	,500	,251	,133	,450	,249

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Infecção

Multiple Comparisons

Rank of G.alfa1.D0

LSD

		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
(I) Infecção	(J) Infecção				Lower Bound	Upper Bound
FIV	FeLV	-4,714286 [*]	1,734994	,018	-8,46251	-,96606
	FIV/FeLV	-7,714286 [*]	2,151995	,003	-12,36339	-3,06518
FeLV	FIV	4,714286 [*]	1,734994	,018	,96606	8,46251
	FIV/FeLV	-3,000000	2,205139	,197	-7,76391	1,76391
FIV/FeLV	FIV	7,714286 [*]	2,151995	,003	3,06518	12,36339
	FeLV	3,000000	2,205139	,197	-1,76391	7,76391

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Anexo 11: Abstract do trabalho apresentado no congresso internacional “The European College of Veterinary Internal Medicine – Companion Animals” em Setembro de 2011.



21st 8th - 10th September 2011
ECVIM-CA CONGRESS

www.ecvimcongress.org

FIBES PALACIO DE CONGRESOS Y EXPOSICIONES DE SEVILLA - AVENIDA ALCALDE LUIS URUÑUELA 1 - SEVILLA

POSTER NO. FE-P-5
COMPLETE BLOOD COUNT (CBC), BIOCHEMISTRY AND SERUM PROTEIN PROFILE EVALUATION IN FELINE IMMUNODEFICIENCY VIRUS (FIV), FELINE LEUKEMIA VIRUS (FELV) AND CO-INFECTED FELV/FIV CATS SUBMITTED TO FELINE IFN O (FE-IFN O) THERAPY.

S. Gil¹, R. Leal¹, A. Duarte¹, N. Sepúlveda², D. McGahie³, I. Siborro¹, J. Cravo¹, C. Cartaxeiro¹, M. Niza¹, L. Tavares¹

¹CISA/Faculty Veterinary Medicine Lisbon, LISBON, Portugal,
²London School of Hygiene and Tropical Medicine, LONDON, United Kingdom, ³Virbac, NICE, France

Retroviruses can induce immunodeficiency syndromes by distinct mechanisms leading to impairment of the immune system or to persistent chronic infection.

In order to evaluate how Fe-IFN alters the course of disease, 16 naturally infected retroviral cats (7 FIV, 6 FeLV and 3 co-infected) housed in a Lisbon Animal Shelter were followed during Fe-IFN therapy: 3 cycles of 5 injections at 1MU/kg SID SC (D0, D14 and D60). Clinical evaluation was assessed and blood samples were collected (D0, D10, D30, D65) to monitor cell line variations (CBC), hepatic enzymes (Alanine-transaminase, Aspartate-transaminase), renal function (Creatinine, Urea) and serum protein profile.

All cats had normal analytical profiles when beginning treatment. Red-blood cell counts did not change significantly in the majority of cats (15/16) during therapy. 14/16 cats maintained normal white-blood cell values while 2/16 cats presented a mild leukocytosis at D65. No changes of hepatic and renal function were observed during therapy.

Despite some mild variations, results revealed that Fe-IFN therapy does not seem to alter CBC values or the measured hepatic and renal parameters.

At D0, protein profile analysis revealed that FeLV and Co-infected cats had increased total proteins (TPs) with normal albuminemia, α 2-hypoglobulinemia, α 1- and β -hypoglobulinemia and a normal to increased gamma profile. FIV cats had a hyperproteinemia with normal albuminemia, α 2-hypoglobulinemia, α 1- and β -hypoglobulinemia and a consistent γ -hyperglobulinemia.

Kruskal-Wallis analysis revealed statistically significant differences that were discriminated by pairwise comparison. The γ -globulins were significantly lower in FIV cats at D0 in comparison to FeLV and co-infected cats ($p < 0.05$). Most relevantly, γ -globulins and TPs decreased in most FeLV and co-infected cats during Fe-IFN therapy (D30 and D65). FIV cats, by comparison, presented higher levels at the end of the treatment than at the beginning.

Differences in the initial and final levels of γ -globulins in FeLV and FIV cats are relevant. Enhancement of γ -globulins is described in retrovirus infections. Actually, increased levels of γ -globulins in FIV infected cats after Fe-IFN therapy could be due to the induction of neutralizing antibodies which are found to be effective in the cat immune response against FIV. Conversely reduction of γ -globulins observed in FeLV cats could be a strong indicator of the benefits of Fe-IFN therapy. In order to deepen this knowledge, cellular and humoral related cytokines need to be quantified and correlated to globulin levels.



INTERFERON- ω THERAPY ON FELINE IMMUNODEFICIENCY AND LEUKEMIA INFECTED STRAY CATS: CLINICAL IMPROVEMENT AND CONTROL OF CONCOMITANT VIRAL EXCRETION

Solange Gil Rodolfo Leal Ana Duarte David Mcgahie Inês Siborro Joana Cravo Clara Cartaxeiro Maria Niza⁵ Luís Tavares

CIISA, Faculty Veterinary Medicine Lisbon, Portugal ² Virbac, Nice, France

Objectives of the Study::

FIV and FeLV viruses are common infectious agents in stray cats and shelter environments. In Veterinary Medicine, therapy is based on immunostimulating drugs such as IFN inducers or IFNs (Human IFN α /Feline IFN ω) (1). Although Human IFN α is currently used, its frequent administration leads to development of antibodies, undermining continuous administration (2).

Recently developed Fe-IFN ω has shown an antiviral action "in vitro" not only against FIV and FeLV but also against feline herpesvirus (3) and calicivirus (4). In order to clarify the improvement of clinical signs in cats naturally infected or co-infected with FIV/FeLV and to correlate this improvement with reduced excretion of concomitant virus, cats naturally infected with FIV/FeLV were followed during Fe-IFN ω therapy.

Materials and Methods:

Eighteen stray cats, housed in a Lisbon Animal Shelter and indicated as retroviral infected were tested for FIV and FeLV (ELISA). Positive cats (16/18: 7/16 FIV, 6/16 FeLV and 3/16 co-infected) were tested for Herpesvirus (QRT-PCR), Calicivirus (PCR) (5) and Coronavirus (QRT-PCR). 2/18 cats were negative for retrovirus and excluded from therapy. Cats received Fe-IFN ω using the licensed protocol (6): 5 injections, 1MU/kg SC SID (Day 0, Day 14, Day 60). At D0, D10, D30 and D65 all cats were submitted to regular clinical evaluations and samples collected for quantification of concomitant virus excretion. At D65, all cats were re-tested for FIV and FeLV.

Results:

ELISA re-testing showed that all FIV cats remained positive while 1 FeLV cat tested negative. Calicivirus prevalence was 14/16 (5/7 FIV, 6/6 FeLV and 3/3 Co-infected) at D0 and from D10 to D65 all the animals tested negative. Coronavirus viral loads at D0 showed 11/16 positives (5/7 FIV, 4/6 FeLV and 2/3 Co-infected) which decreased in 4/5 FIV cats, 3/4 FeLV cats and in all Co-infected cats. 11/16 were Herpesvirus positive at D0 (4/7 FIV, 5/6 FeLV and 2/3 Co-infected). Its viral excretion during therapy is under current analysis.

Clinical evaluation revealed that 10/16 cats improved their clinical signs with Fe-IFN ω therapy (5/7 FIV, 3/6 FeLV and 2/3 co-infected) while 6/16 remained stable during treatment.

Conclusions:

In conclusion, Fe-IFN ω therapy is helpful in the improvement of clinical signs in FIV and FeLV Co-infected cats and it is particularly relevant in the control and decrease of concurrent viral excretion namely Calicivirus and Coronavirus.

Bibliography:

- (1) Hosie, M.J., et al., Feline immunodeficiency. ABCD guidelines on prevention and management. J Feline Med Surg, 2009. 11(7): p. 575-84.
- (2) Zeidner, N.S., et al., Alpha interferon (2b) in combination with zidovudine for the treatment of presymptomatic feline leukemia virus-induced immunodeficiency syndrome. Antimicrob Agents Chemother, 1990. 34(9): p. 1749-56.
- (3) Bracklein, T., et al., Activity of feline interferon-omega after ocular or oral administration in cats as indicated by Mx protein expression in conjunctival and white blood cells. Am J Vet Res, 2006. 67(6): p. 1025-32.
- (4) Radford, A. D., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hartmann, K., Hosie, M.J., Lloret, A., Lutz, H., Marsilio, F., Pennisi, M. G., Thiry, E., Truyen, U. and Horzinek, M. C., Feline calicivirus infection. ABCD guidelines on prevention and management. Journal of Feline Medicine & Surgery Volume 11, Issue 7, July 2009, Pages 556-564
- (5) Wilhelm, S. and U. Truyen, Real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay to detect a broad range of feline calicivirus isolates. Journal of Virological Methods, 2006. 133(1): p. 105-108.
- (6) de Mari, K., et al., Therapeutic effects of recombinant feline interferon-omega on feline leukemia virus (FeLV)-infected and FeLV/feline immunodeficiency virus (FIV)-coinfected symptomatic cats. J Vet Intern Med, 2004. 18(4): p. 477-82.